24 NOV 1962
C3A121
SEPARATE

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 2, n.º 4, p. 191 - 242 ★ Julho / Agosto, 1960

O caminho certo na terapia da amebíase...

DIANTIL

(Clorbetamida)

Amebicida não-metálico...

de ação intensa...

com doses reduzidas

"Diantil é um amebicida sintético não-metálico que se caracteriza por grande atividade e baixa toxicidade". *E. W. Dennis e D. A. Berberian, Antibiotics & Chemotherapy, 6:554, maio, 1954.*

"O que mais sobreleva notar, no tratamento com Diantil, é sua perfeita tolerância." *D. T. Lucena e R. J. Marques, Revista Brasileira de Medicina, vol. XIII, n.º 11, nov. 1955.*

D 11 - 60

Comprimidos contendo 0,5 g de N-(2,4-diclorobenzil)-N-(2-hidroxietil) dicloroacetamida. Caixas de 24

DIANTIL Marca registrada é um produto **WINTHROP**

WINTHROP

Distribuidores: The Sydney Ross Co., Av. Rio Branco, 251, 11.º and., Rio de Janeiro

Galeria de Tropicalistas Brasileiros

GASPAR VIANNA

Gaspar de Oliveira Vianna nasceu em Belém do Pará, a 11 de maio de 1885. Após completar sua educação secundária na cidade natal, transferiu-se para o Rio de Janeiro onde cursou com brilho a Faculdade de Medicina e doutorou-se em 1909.

Ainda estudante, lecionava histologia a seus colegas e, em 1907, conquistava o cargo de Assistente do Gabinete Anátomo-patológico do Hospital Nacional de Alienados, classificando-se no concurso em primeiro lugar.

Logo que terminou o curso médico, foi chamado por Oswaldo Cruz para assumir a direção da secção de anatomia patológica do Instituto Oswaldo Cruz.

Em 1913 alcançou o título de Docente-Livre da Faculdade de Medicina, com um trabalho sôbre blastomicose e, no mesmo ano, foi nomeado para reger a cadeira de Histologia da Escola de Agricultura e Medicina Veterinária.

Sua curta e modesta existência não durou mais que 29 anos, pois veio a falecer em 14 de junho de 1914. Deixou publicados apenas 18 trabalhos versando sôbre diversos assuntos; mas a qualidade e o êxito de suas investigações o colocaram definitivamente entre os mais altos expoentes da medicina brasileira.

No necrológio, publicado na época pelos "Anais do Instituto Oswaldo Cruz", destacava-se que pertencia a êle ùnicamente tudo o que se sabia sôbre a anatomia patológica da moléstia de Chagas. Esclareceu o ciclo do *Trypanosoma cruzi,* demonstrando sua multiplicação sob a forma de leishmânias intracelulares, estudou a anatomia patológica da forma cardíaca e nervosa da doença, além de estender suas observações sôbre a evolução de outros tripanosomas.

Isolou e descreveu nova espécie de fungo patogênico — *Proteomyces infestans,* Moses & Vianna, 1913 (= *Geotricum infestans*) — e um espiroqueta do gambá. Fêz estudos sôbre o granuloma venéreo, a blastomicose, etc.

Em 1911, mostrou ser espécie distinta da *Leishmania tropica* o agente etiológico da "úlcera de Bauru", descoberto em São Paulo por Lindenberg e por Carini & Paranhos, criando então o nome *Leishmania brasiliensis.*

No ano seguinte, fazia sua mais alta contribuição ao progresso da medicina, reintroduzindo no arsenal terapêutico o uso das drogas antimoniais, relegadas de há muito a completo esquecimento, desde que banidas pelo Parlamento de Paris em 1566. Instituiu o tratamento do granuloma inguinal pelo tártaro emético só recentemente destronado pelos modernos antibióticos. Com o mesmo medicamento solucionou de modo espetacular o problema das leishmanioses.

A leishmaniose tegumentar americana era responsável pelas lesões deformantes graves com que atingia freqüentemente, em nosso meio, o maciço facial; a leishmaniose visceral ou calazar era responsável por centenas de milhar de casos anuais, sòmente na Índia e na China, com mortalidade que alcançava 80 a 95% dos pacientes.

Tão precoce e rápida trajetória científica fêz compreender claramente a seus contemporâneos a perda considerável que, com sua morte, atingia, em plena alvorada, a medicina experimental do Brasil.

L. Rey

Gallery of Brazilian Tropicalists

GASPAR VIANNA

Gaspar de Oliveira Vianna was born on May 11, 1885, in Belém do Pará. Having finished high school in his native city he moved to Rio de Janeiro, where he did a brilliant course at the School of Medicine. He obtained his M.D. in 1909.

While still a student he delivered lectures on Histology to his classmates and, in 1907, he obtained a post as Assistant to the Anatomo-pathologic Department of the National Hospital for the Alienated, after winning the first place in a contest for it.

Soon after graduating he was called upon by Oswaldo Cruz to head the Anatomo-pathologic Department of the Oswaldo Cruz Institute.

In 1813 he obtained the title of "Docente-Livre" at the School of Medicine with a work on blastomycosis; in the same year he was appointed Professor of Histology at the School of Agriculture and Veterinary Medicine.

His short and modest life was of 29 years only, for he passed away on June 14, 1914. He published only 18 papers upon various subjects. Nevertheless, the quality and success of his investigations sited him most definitely amongst the higher values of Brazilian medicine.

The necrology published at the time by the "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz" said that all that was known about the pathologic anatomy of Chagas' disease was due to Vianna only. He explained the cycle of *Trypanosoma cruzi*, demonstrating its multiplication as intracellular leishmanias; he also studied the pathologic anatomy of the disease's cardiac and nervous forms, besides observations on the evolution of other trypanosomes.

Vianna isolated and described a new species of pathogenic fungs — *Proteomyces infestans*, Moses & Vianna, 1913 (= *Geotricum infestans*) — and an opossum spirochete. He also studied venereal granuloma, blastomycosis, etc.

In 1911 Vianna showed that the etiologic agent of the "Bauru ulcer", discovered in São Paulo by Lindenberg and Carini & Paranhos, was a species distinct from *Leishmania tropica*, giving it the name of *Leishmania brasiliensis*.

In the following year he came forward with his utmost contribution to medical progress, introducing again in the therapeutic arsenal the use of antimonial drugs that had for ever so long been prey to oblivion, since banished by the Parliament of Paris in 1566. It was he who proposed inguinal granuloma treatment through tartar emetic, and this has but recently only been superseded by the modern antibiotics. With the same drug he solved most spectacularly the problem of leishmaniases.

American leishmaniasis was responsible for the serious deforming lesions that were frequently sustained by the facial massif among us; the visceral leishmaniasis, or kala-azar, was responsible for hundreds of thousands of annual ocurrences in India and China only, not to mention other places, with a mortality rate of 80 to 95% of the patients.

A scientific trajectory so precocious and short made his contemporaries understand the important loss which Vianna's passing away caused to experimental medicine in Brazil, then at its very dawn.

L. Rey

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/revista-do-instituto-de-medicina-tropical-de-sao-paulo_july-august-1960_2_4

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):195-203, julho-agôsto 1960

SÔBRE OS RESERVATÓRIOS NATURAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Oswaldo P. FORATTINI [1]

RESUMO

Após passar em revista a literatura existente sôbre o assunto, o autor relata os resultados de suas investigações sôbre a existência de reservatórios naturais da *Leishmania braziliensis*. Foram encontradas leishmânias em três roedores silvestres das seguintes espécies: *Kannabateomys amblyonyx*, *Cuniculus paca* e *Dasyprocta azarae*. A identificação dessas leishmânias com a produtora da moléstia no homem, não foi possível. A interpretação dêsses resultados, juntamente com os dados conhecidos até agora, permite construir hipótese sôbre a estrutura epidemiológica da leishmaniose tegumentar na natureza. Essa estrutura compreenderia dois tipos, um selvático com reservatórios silvestres, e outro mais adaptado ao homem, com reservatórios domésticos.

INTRODUÇÃO

A questão da existência de reservatório natural da *Leihmania braziliensis* constitui ainda questão aberta à investigação. Até bem recentemente, as pesquisas limitavam-se a observações esporádicas, principalmente em animais domésticos. Tais achados, devido mesmo a êsse caráter de raridade, não permitiam responsabilizar os animais como reservatórios epidemiològicamente importantes do parasita. Em vista disso, tem-se atribuído êsse papel sòmente ao homem doente. Porém as evidências epidemiológicas têm demonstrado que, na Região Neotropical, a maioria das zonas de endemia está ìntimamente relacionada a áreas florestais, via de regra escassamente habitadas. Êsse fato sugere fortemente que a moléstia não deva ser primàriamente humana, mas sim, de alguma ou algumas espécies de animais silvestres.

Passando em revista a literatura existente sôbre o assunto, pode-se verificar o que acima referimos, ou seja, que grande número de encontros se reveste de certo caráter de acidentalidade. Isso torna-os dificilmente enquadráveis na cadeia epidemiológica normal da moléstia. Dessa forma, é de se desejar que as várias observações devam ser conduzidas e analisadas em relação com os aspectos epidemiológicos peculiares a cada região.

Com o objetivo de investigar êsse problema, vimos realizando observações na zona endêmica do Estado de São Paulo, Brasil, compreendida nos arredores da nova cidade de Teodoro Sampaio, Município de Marabá Paulista. A análise dos dados obtidos pelos vários autores (Quadro I) e o relato daqueles conseguidos por nós até o momento, serão objeto da presente publicação.

Adotando critério epidemiológico e com o objetivo de facilitar os comentários posteriores, relataremos, em parágrafos distintos, as observações até aqui publicadas sôbre animais domésticos e silvestres.

Fac. Higiene e Saúde Pública — Dep. Parasitologia (Prof. J. O. Coutinho).
Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.
(1) Prof. adjunto.

QUADRO I

Animais examinados para pesquisa de portadores de leishmaniose tegumentar americana (segundo diversos autores, até 1959)

Animais	Lugares	Com lesões no tegumento	Pesquisa de leishmânias	Autores
DOMÉSTICOS:				
Cão	Brasil, Amazonas .	+	—	Gordon & Young [7]
	Brasil, Ceará	+	+	Deane & Deane [4]
	Brasil, São Paulo .	+	+	Pedroso [16,17]; Brumpt & Pedroso [3]; Forattini & Santos [6]
	Brasil, São Paulo .	+	—	Pessôa & Barretto [18]; Forattini, Pattoli & Aun [5]
	Venezuela, Yaracuy	+	+	Pifano, C.[19]
	Peru, Huarochiri .	+ e —	+	Herrer [8]
	Paraguai (norte).	+	—	Migone [15]
	Argentina, Salta .	+	+	Mazza [12,13]
	Argentina, Tucumán	+	+	Romaña et al.[20]
Gato	Brasil, Pará	+	+	Mello [14]
Jumento	Brasil, Ceará	+	+	Alencar [1]
Cavalo	Argentina, Salta .	+	+	Mazza [13]
SILVESTRES:				
Cutia (*Dasyprocta* sp.) ...	Brasil, São Paulo .	+	—	Brumpt & Pedroso [3]; Brumpt [2]
Paca (*Cuniculus paca*) ...	Brasil, São Paulo .	+	?	Forattini & Santos [6]
Rato de espinho (*Proechymys semispinosus panamensis*)	Panamá	—	+	Hertig, Fairchild & Johnson [9,10]
Rato de espinho (*Hoplomys gymnurus*)	Panamá	—	+	Hertig, Fairchild & Johnson [11]

Animais domésticos. — Desde as primeiras verificações de PEDROSO [17], o cão tem sido a espécie sôbre a qual mais se concentraram as atenções dos investigadores. Além dêle, outros foram encontrados infectados, como o cavalo (MAZZA [13]), o gato (MELLO [14]) e o jumento (ALENCAR [1]). Êstes últimos achados, dado o caráter esporádico, têm por enquanto importância muito reduzida.

No estado atual de nossos conhecimentos, o encontro de cães portadores de leishmânias atribuíveis à *L. braziliensis*, reveste-se de dois aspectos. O primeiro consiste em animais apresentando lesões do tegumento nas quais foi ou não possível demonstrar a presença do parasita. Há numerosos casos em que tais lesões se mostraram negativas ao exame parasitológico (MIGONE [15], GORDON & YOUNG [7], PESSÔA & BARRETTO [18], FORATTINI, PATTOLI & AUN [5]). Neste primeiro aspecto parece que de modo geral os achados revelaram, quando positivos, constante pobreza de formas parasitárias. Êsse fato foi confirmado através inoculações experimentais, por FORATTINI, PATTOLI & AUN [5]. A pequena receptividade canina à infecção leishmaniótica, tem sido até agora observada em tôdas as regiões onde foi investigada, com exceção das zonas utógenas do Peru. Nestas, HERRER [8] verificou algo diferente e que nós, na mesma ordem de idéias que estamos expondo, catalogamos em um segundo tipo ou aspecto.

O autor citado teve a oportunidade de encontrar, e com bastante freqüência, cães portadores de abundantes leishmânias localizadas no tegumento. Tais formas parasitárias foram encontradas, não sòmente em lesões de pequena monta, como peladas, crostas e escoriações, mas também na pele íntegra. Êste aspecto é pois completamente diferente do primeiro. Êle apresenta certos caracteres peculiares como freqüência da infecção, abundância de parasitas e pequena gravidade ou mesmo ausência de lesões cutâneas. Assim sendo, autoriza a encarar o cão, naquela região endêmica, sob um outro prisma. É o que teremos ocasião de expor mais adiante.

Animais silvestres. — Até muito recentemente, as poucas investigações destinadas a revelar a infecção natural em espécies silvestres, forneceram resultados negativos. No Estado de São Paulo, BRUMPT & PEDROSO [3] relataram o encontro de duas cutias (*Dasyprocta*) portadoras de úlceras cutâneas cujo aspecto julgaram sugestivo. BRUMPT [2], em seu Tratado de Parasitologia, publica a fotografia de um dêsses animais, na qual se pode notar a presença de grande lesão no lado direito da face. O referido autor atribuiu provável etiologia leishmaniótica a essa lesão, embora isso não pudesse ser comprovado pelo correspondente exame parasitológico. WEISS [21], trabalhando em regiões endêmicas do Peru, examinou 750 animais sem qualquer resultado positivo. Ainda no Estado de São Paulo, PESSÔA & BARRETTO [18] também não tiveram sucesso ao examinar vários animais selvagens. FORATTINI & SANTOS [6], trabalhando na mesma região, tiveram a oportunidade de, ao investigar 23 espécimes silvestres, encontrar um exemplar de paca (*Cuniculus paca*) portador de lesão cutânea onde observaram algumas formas que rotularam apenas como "suspeitas", dada a raridade das mesmas.

Os conhecimentos sôbre êsse assunto estavam nesse ponto quando, no Panamá, HERTIG, FAIRCHILD & JOHNSON [9, 10] conseguiram resultados interessantes com algumas espécies de roedores silvestres. Partindo do princípio de que os reservatórios naturais não estariam necessàriamente obrigados a apresentar qualquer lesão cutânea, passaram a realizar hemoculturas, principalmente em roedores e marsupiais. Com tal orientação conseguiram obter resultados positivos em apreciável número de exemplares pertencentes a algumas espécies de ratos silvestres. Inicialmente em *Proechymys semispinosus panamensis* e, posteriormente (HERTIG, FAIRCHILD & JOHNSON [11]), também em *Hoplomys gymnurus*. Tais animais fazem parte de um grupo de roedores selváticos conhecidos pelo nome geral de ratos de espinho. A filiação das culturas assim isoladas à leishmaniose tegumentar foi comprovada pelos mesmos autores, mediante inoculação em voluntário e subseqüente produção da lesão leishmanió-

tica. Por outro lado as inoculações levadas a efeito em numerosos animais de laboratório, inclusive em ratos pertencentes à mesma espécie daqueles em que foram isoladas as culturas, forneceram, até agora, resultados constantemente negativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante os anos de 1958 e 1959, realizamos capturas e exames de animais silvestres em zona endêmica do Estado de São Paulo, Brasil.

A área escolhida para sede de nossos trabalhos situa-se a pequena distância da cidade de Teodoro Sampaio, no extremo oeste do Estado (Fig. 1).

Dentro do aspecto clássico e já conhecido, de endemicidade da leishmaniose tegumentar, essa região enquadra-se no conceito de "zona nova", ou seja, área de colonização recente. O aspecto que caracteriza tais zonas é o abundante revestimento florestal. Acresce o fato de que, no caso particular que estamos focalizando, a densidade das matas foi garantida graças à conservação da Reserva Florestal do Estado, que ali se acha instalada.

As matas são do tipo já conhecido para tôda a bacia do rio Paraná, apresentando elementos altos, madeiras de lei e vários padrões indicativos da qualidade das terras. Como em tôda região nova, encontra-se o patrimônio ou centro urbano, que aqui é representado por Teodoro Sampaio. A zona rural, em senso estrito, é constituída pelas áreas de atividade agrícola formando o conjunto dos sítios e fazendas. São os habitantes dessas propriedades que fornecem o contingente de casos humanos da moléstia.

Para a coleta de animais silvestres, escolhemos vários pontos situados nas proximidades dos locais, onde, durante os anos mencionados, ocorreram vários casos iniciais de leishmaniose tegumentar. Tais postos de captura foram instalados no Sítio do Córrego Sêco, na Fazenda São Vicente e no Pouso da Taquara (antiga Fazenda Coração). Os dois primeiros, nos limites e o último dentro da área da Reserva Florestal (Fig. 1).

Fig. 1 — Localização da região trabalhada (indicada por flecha no mapa superior) e dos postos de captura de animais silvestres, nos arredores de Teodoro Sampaio, Município de Marabá Paulista, no Estado de São Paulo (mapa inferior).

Os animais, uma vez capturados, são submetidos à punção cardíaca. O sangue recolhido é semeado em tubos contendo o meio de NNN. Se o tegumento apresentar alguma lesão, retira-se material para a realização de esfregaços em lâminas e ulterior exame histológico, se necessário. Os tubos contendo o sangue semeado são mantidos em observação, à temperatura ambiente do laboratório, até 30 ou 40 dias após a semeadura.

RESULTADOS

Até fins de 1959 foram capturados e examinados 928 animais, a maioria dos quais roedores (Quadro II). Predominaram os representantes dos gêneros *Akodon*, *Oryzomys* e *Cavia*, se bem que em nenhum dêles tenha sido possível observar a presença de leishmânias. De todos êsses animais, sòmente três revelaram-se positivos ao exame.

QUADRO II

Relação dos animais capturados e examinados, até novembro de 1959, na região de Teodoro Sampaio, Estado de São Paulo

Espécies	Nº de espécimes examinados	Nº de positivos p/ *Leishmania* sp.
ROEDORES:		
Akodon e *Oryzomys* (*A. arviculoides, A. serrensis, Akodon* sp., *O. eliurus, O. flavescens, O. subflavus, O. laticeps, O. ratticeps, O. wavrini, Oryzomys* sp.)	620	—
Oxymycterus (*O. quaestor, O. rufus, Oxymycterus* sp.)	21	—
Cavia aperea	145	—
Nectomys squamipes	35	—
Cuniculus paca	18	1
Dasyprocta azarae	23	1
Kannabateomys amblyonyx	4	1
Phyllomys medius	1	—
Sciurus ingrami	2	—
Indetermináveis	12	—
OUTRAS ORDENS:		
Didelphis e *Marmosa* (*D. paraguayensis, D. aurita, Didelphis* sp., *Marmosa* sp.)	35	—
Cebus nigritus	7	—
Cerdocyon thous	2	—
Procyon cancrivorus	2	—
Tayra barbara	1	—
Total	928	3

O primeiro foi um exemplar de rato de taquara, pertencente à espécie *Kannabateomys amblyonyx* (Fig. 2). Êste animal foi capturado no Sítio do Córrego Sêco, em março de 1958. A hemocultura revelou-se positiva ao exame levado a efeito decorridos 20 dias de semeadura. No tegumento, o roedor apresentava pequena úlcera crosto-

Fig. 2 — Kannabateomys amblyonyx.

sa localizada no dorso do focinho. O exame do material que dela foi colhido revelou abundantes leishmânias.

O segundo achado refere-se a um exemplar de paca, pertencente à espécie *Cuniculus paca*, que foi obtido no Pouso da Taquara, na mesma ocasião que o anterior. A hemocultura revelou-se positiva ao exame realizado 30 dias após a semeadura. No tegumento, nada foi constatado digno de nota.

As duas culturas assim obtidas, foram mantidas em laboratório através sucessivos repiques, até recentemente, quando se perderam. Antes disso, porém, forneceram material que foi inoculado, subcutânea e intraperitonealmente, em cobaias, hamsters, ratos brancos e camundongos. Os resultados foram completamente negativos.

O terceiro encontro foi em um exemplar de cutia capturado em julho de 1959, também no Sítio do Córrego Sêco, da espécie *Dasyprocta azarae*. Êste animal não forneceu hemocultura positiva, mas, à inspeção do tegumento, revelou extensa lesão ulcerosa situada na face dorsal do focinho (Fig. 3). O exame do material colhido dessa úlcera evidenciou a presença de formas em leishmânia, tanto em esfregaços como em cortes histológicos. As subseqüentes tentativas para obter culturas, tanto a partir do sangue circulante como do material retirado diretamente da lesão, foram completamente infrutíferas. Foi possível encontrar também algumas formas sangüíneas de tripanosomas. Estas, como se poderá apreciar pela Fig. 4, eram do tipo *lewisi* e por êsse fato acreditamos ser difícil filiar as duas formas observadas, a uma mesma espécie de protozoário parasita. Utilizando o material da lesão e o sangue circulante, foram tentadas várias inoculações, por vias subcutânea e intraperitoneal. Foram usados vários animais como cobaios, hamsters, camundongos, ratos brancos, um macaco (*Cebus* sp.) e uma cutia (*Dasyprocta* sp.). Os resultados foram completamente negativos. Com vistas ao tripanosoma, alimentaram-se sôbre o animal em questão 80 exemplares (adultos e ninfas) de *Triatoma infestans* criados em laboratório. Também aqui, os resultados foram negativos.

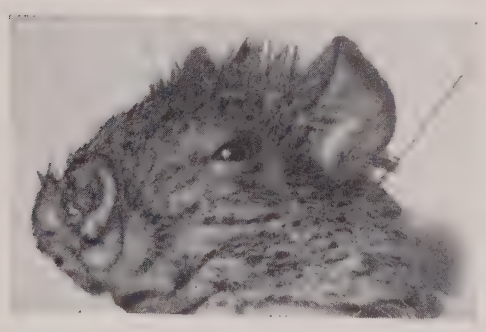


Fig. 3 — Exemplar de Dasyprocta azarae *com lesão ulcerosa cutânea.*

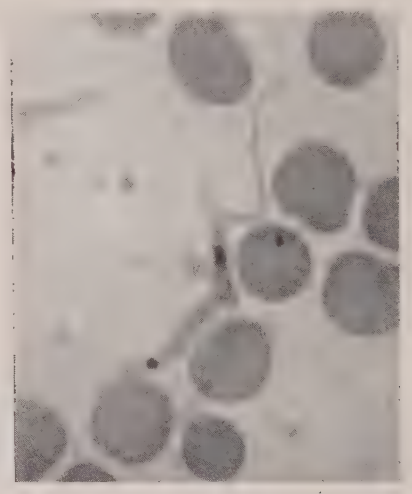


Fig. 4 — Tripanosoma encontrado em esfregaço de sangue circulante de Dasyprocta azarae.

COMENTÁRIOS

No estado atual de nossos conhecimentos, verifica-se, inicialmente, certa disparidade nos resultados das investigações levadas a efeito nas várias regiões do Continente Americano. No capítulo referente aos reservatórios domésticos deve-se, inegàvelmente, assinalar a significância dos achados de HERRER [8] no cão. Os dados obtidos por êsse autor indicam fortemente que, no ambiente peculiar das regiões por êle trabalhadas, tal animal desempenha importante papel como reservatório. É o aspecto das regiões de "uta" no Peru, que é completamente distinto do das áreas endêmicas em outros pontos do Continente. Com efeito, os vales dos rios andinos da Província de Huarochiri, sede daquelas investigações, caracterizam-se

por serem desprovidos de florestas e possuírem apreciável densidade demográfica. A vegetação ali existente é apenas arbustiva ou rasteira, emprestando certo aspecto de aridez à região. Tal ambiente deveria, seguramente, condicionar estrutura epidemiológica peculiar à moléstia. E é, a nosso ver, o que acontece na realidade. Em outras palavras, a um "habitat" diferente corresponde comportamento ecológico também diferente, por parte dos vários componentes da cadeia epidemiológica. Nessa ordem de considerações, é cabível concluir que, em tal meio, tenha havido a adaptação do parasita ao hospedeiro canino, passando então êste a representar o papel epidemiológico de reservatório natural, na região.

Em outros ambiente, encontram-se outras situações. São áreas florestais com pequena densidade humana. Lògicamente, há também pequeno número de animais domésticos, entre os quais, cães. Em tais casos, portanto, êstes últimos estarão expostos aos mesmos riscos do homem e poderão infectar-se com leishmânias. Isso porém será um fato acidental e, como não houve tempo para a necessária adaptação entre parasita e hospedeiro, o cão não desempenhará a função de reservatório normal nessa cadeia epidemiológica. Tal papel deverá, pois, ser procurado em outros animais que, sendo habitantes normais dessas regiões, tenham tido a possibilidade de sofrer tal adaptação. É o caso das espécies silvestres. Os achados de HERTIG, FAIRCHILD & JOHNSON [9, 10, 11] corroboram nesse sentido, e a êles acrescentamos os nossos, relatados atrás.

Em conclusão, podemos aventar a hipótese de que as leishmânias tegumentares constituam, não uma espécie bem definida, mas sim um complexo de raças ou subespécies atualmente em processo de especiação. Tais raças, em seu "habitat" primitivo florestal, teriam se adaptado ou estariam se adaptando a animais ali existentes. Algumas delas, poderiam ser transmitidas ao homem e animais domésticos, desde que os mesmos entrassem em contato com êsse ambiente. Isso poderia explicar a existência das várias modalidades clínicas observadas e que, ainda hoje, constituem objeto de descrições. Tal seria, pois, a estrutura epidemiológica da leishmaniose tegumentar das florestas.

Porém, quando a região é diferente e a população humana é mais densa e antiga, pode ocorrer a possibilidade de maior adaptação ao homem e animais domésticos. E de tal maneira que êstes, ou mesmo aquêle, podem passar a desempenhar a função de reservatório do parasita. Tal seria o caso do cão doméstico, nas zonas utógenas do Peru (HERRER [8]). Dessa maneira, constitui-se uma cadeia epidemiológica originária da primeira, mas que se pode separar dela e manter a endemia de forma independente.

Como índice de adaptação do parasita ao hospedeiro, acreditamos que seria de valor observar o tipo de lesões provocadas por aquêle. É de se pensar que, quanto maior o grau de adaptação, menor a gravidade das lesões, podendo mesmo chegar a atingir o estado de equilíbrio onde estas não mais se manifestam. É o que acontece com os roedores encontrados no Panamá por HERTIG, FAIRCHILD & JOHNSON [9, 10, 11] dos cães no Peru observados por HERRER [8] e de alguns encontros nossos relatados neste trabalho.

CONCLUSÕES

Em resumo, podemos admitir o seguinte:

A — Existe um complexo de raças ou subespécies de *Leishmania*, em seu "habitat" primitivo florestal, que estão adaptadas ou em processo de adaptação a diversos animais selváticos.

B — Cada espécie animal, na qual se dá esta adaptação, pode funcionar como barreira ecológica em relação às outras espécies. Êsse fato poderia explicar os insucessos obtidos nas inoculações experimentais de animais de laboratório com as leishmânias isoladas das espécies silvestres.

C — Algumas raças podem, acidentalmente, se instalar na organismo humano ou de animais domésticos que freqüentem o ambiente florestal. Daí as diversas modalidades clínicas, variáveis conforme a região geográfica.

D — Quando o ambiente se torna mais densamente povoado, a adaptação do parasita poderá fazer-se nos animais domésticos.

Neste caso, êstes poderão passar a desempenhar a função de reservatórios naturais epidemiològicamente importantes.

No esquema que apresentamos abaixo, resumimos as hipóteses emitidas acima. Nêle estão representados os vários tópicos, da seguinte maneira:

1 — Complexo de raças de *Leishmania* em seu "habitat" primitivo, provàvelmente florestal, adaptadas ou em vias de adaptação a várias espécies de animais silvestres.

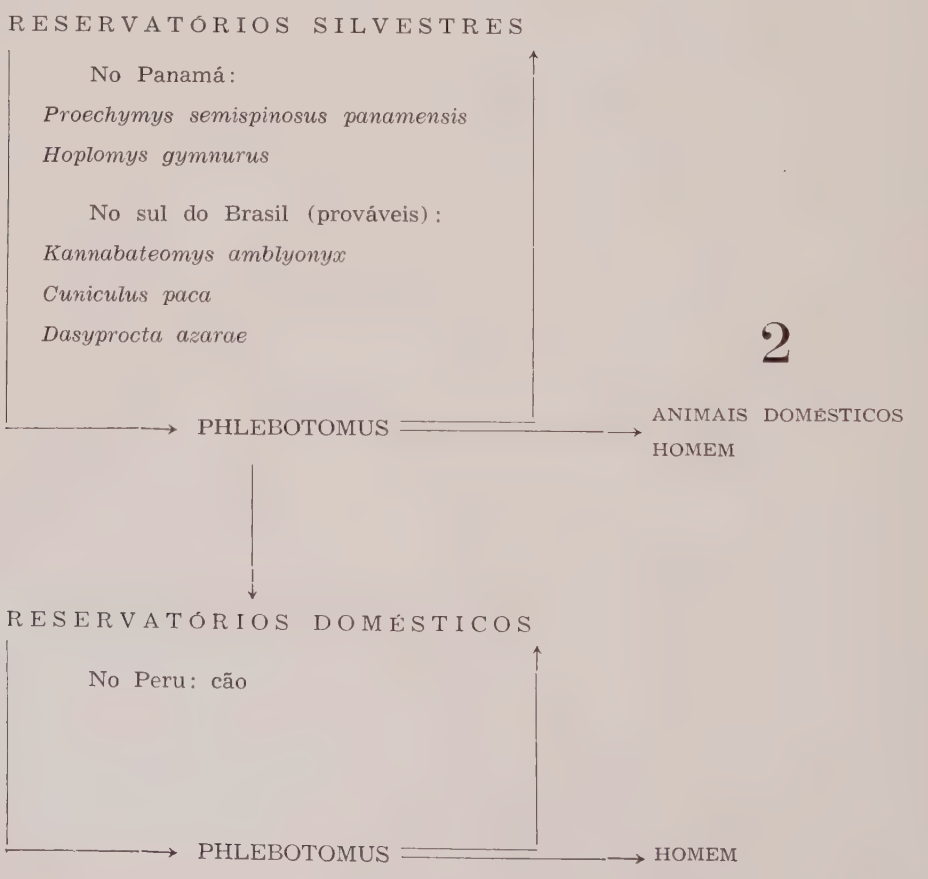
2 — Transmissão de algumas dessas raças ao homem e animais domésticos que freqüentam o ambiente florestal.

3 — Estrutura epidemiológica particular, nos casos em que houve adaptação do parasita aos animais domésticos (no caso figurado, o cão), os quais passam assim a funcionar como reservatórios naturais da infecção.

SUMMARY

On the natural reservoirs of American cutaneous leishmaniasis.

After studying the known data on the subject, the author presents the results of his investigations on the existence of natural reservoirs of *Leishmania braziliensis*. Leishmaniae were found in three wild rodents of the following species: *Kannabateomys amblyonyx*, *Cuniculus paca* and *Dasyprocta azarae*. It has not been possible to identify these leishmania with the etiological agent of the human disease. The interpretation of these results, as well as the data known up to the present lead the author to build a hypothesis on the epidemiological structure of cutaneous leshmaniasis in nature. He admits two epidemiological types, a selvatic one with wild reservoirs, and another more adapted to human communities, with domestic reservoirs.



AGRADECIMENTOS

A identificação dos animais capturados foi feita inicialmente pelo saudoso Dr. Carlos da Cunha Vieira. Com o falecimento dêsse pranteado especialista, passamos a contar com os préstimos dos Drs. Cory T. de Carvalho, do Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, e Charles O. Handley Jr., do United States National Museum. A êsses conceituados investigadores deixamos consignados aqui os nossos agradecimentos.

REFERÊNCIAS

1. ALENCAR, J. E. de — Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. Trabalho apresentado ao XIV Congr. brasil. Hig., Niterói, 1959.

2. BRUMPT, E. — Précis de Parasitologie. 6e. éd. Paris, Masson, 1949.

3. BRUMPT, E. & PEDROSO, A. M. — Pesquisa epidemiológica sôbre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo (Brasil). An. paulistas Med. Cir. **1**:97-132, 1913.

4. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem em Sobral, Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **47**:113-129, 1955.

5. FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. & AUN, J. R. — Algumas observações sôbre o comportamento da *Leishmania brasiliensis* em cães. Arq. Fac. Hig. Saúde públ. Univ. São Paulo **7**:137-155, 1953.

6. FORATTINI, O. P. & SANTOS, M. R. dos — Novas observações em regiões endêmicas de leishmaniose tegumentar americana nos Estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil. Rev. clín. São Paulo **31**:13-20, 1955.

7. GORDON, R. M. & YOUNG, C. J. — Parasites in dogs and cats in Amazonas. Ann. trop. Med. **36**:297-300, 1922.

8. HERRER, A. — Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Peru. V. Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utógenas. Rev. Med. exper. **8**:87-118, 1949/51.

9. HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B. & JOHNSON, C. M. — Leishmaniasis transmission; reservoir project. Ann. Rep. Gorgas Mem. Lab. (1956) p. 9-11, 1957.

10. HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B. & JOHNSON, C. M. — Leishmaniasis transmission; reservoir project. Ann. Rep. Gorgas Mem. Lab. (1957) p. 7-11, 1958.

11. HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B. & JOHNSON, C. M. — Leishmaniasis transmission; reservoir project. Ann. Rep. Gorgas Mem. Lab. (1958) p. 11-15, 1959.

12. MAZZA, S. — Existencia de la leishmaniosis cutánea en el perro en la República Argentina. Bol. Inst. Clín. quir. **2**:147-148, 1926.

13. MAZZA, S. — Leishmaniosis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro. Bol. Inst. Clín. quir. **3**:462-464, 1927.

14. MELLO, G. B. — Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero Leishmânia. Brasil méd. **54**:180, 1940.

15. MIGONE, L. E. — La buba du Paraguay, leishmaniose américaine. Bull. Soc. Pathol. éxot. **6**:210-218, 1913.

16. PEDROSO, A. M. — Infecção de cão pela leishmânia tropical. Rev. Med., São Paulo **7**:42-45, 1923.

17. PEDROSO, A. M. — Leishmaniose local do cão. An. paulistas Med. Cir. **1**:33-39, 1913.

18. PESSÔA, S. B. & BARRETTO, M. P. — Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro, Ministério da educação e saúde, 1948.

19. PIFANO C., F. — La leishmanosis tegumentaria en el Estado Yaracuy, Venezuela. Rev. Policlín. Caracas **9**:3639-3658, 1940.

20. ROMAÑA, C.; NAJERA, L.; CONEJOS, M. & ABALOS, J. W. — I. Leishmaniosis tegumentaria en perros de Tucumán. II. Foco doméstico de leishmaniosis. An. Inst. Med. region. **2**:283-292, 1949.

21. WEISS, P. — Die "Espundia"; Beiträge zum Studium dieser Hautleishmaniosis in Peru. Arch. Schiffs- u. Tropen-Hyg. **31**:311-321, 1927.

Recebido para publicação em 18 julho 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):204-212, julho-agôsto 1960

ESTUDO DA DISCREPÂNCIA RELATIVA ENTRE PARES DE REAÇÕES SIMULTÂNEAS DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO NO SISTEMA MOLÉSTIA DE CHAGAS

José Oliveira de Almeida [1] e Astolpho Ferraz Siqueira [2]

RESUMO

A reprodutibilidade de resultados obtidos por fixação de complemento em moléstia de Chagas foi medida, em reações feitas concomitantemente, com os mesmos elementos e com o mesmo antígeno. Os pares de resultados ou títulos dos soros chagásicos foram comparados por métodos essencialmente semelhantes aos utilizados para antígenos como cardiolipina ou fosfolipídeos extraídos de bacilo da tuberculose, tendo para isso sido construída uma tabela de graus de reatividade (G) baseada nos fatôres de conversão prèviamente determinados para o sistema moléstia de Chagas com o antígeno gelificado de *Trypanosoma cruzi*. De um total de 311 pares de reações, 12 foram inadmissíveis e as restantes 299 não mostraram nenhuma observação defeituosa. As diferenças de reatividade, traduzidas por ΔG foram projetadas em abscissas contra a freqüência percentual acumulada de observações. Os dados foram tratados por métodos construídos para distribuição-livre ou não paramétrica do atributo e intervalos de confiança de 95% e 99% foram calculados. Os resultados não apresentaram discrepâncias maiores que as observadas em sistemas que empregam antígenos de composição definida (cardiolipina) e soros de títulos altos. Os dados foram apresentados em quadros e arranjados convenientemente para serem examinados por métodos estatísticos de inferência de distribuição-livre ou não-paramétrica.

INTRODUÇÃO

O propósito dêste trabalho é indicar a distribuição de freqüência de valores de discrepâncias numéricas relativas, observadas em reações em duplicata com antígenos preparados de *Trypanosoma cruzi* e soros chagásicos. Há grande interêsse em verificar se defeitos técnicos ou a falta de homogeneidade do antígeno empregado poderiam trazer imprecisão ou discrepâncias a reações feitas em duplicata, a ponto de proibir a adoção dos métodos construídos para antígenos mais puros, tais como cardiolipina [6] ou fosfolípides extraídos do bacilo da tuberculose [1]. Usar os mesmos elementos em reações paralelas e simultâneas propicia-nos condições ideais para fazer uma prova de confiança na técnica em uso. A presente investigação foi realizada durante um longo tempo empregando-se várias preparações de antígeno, de complemento, de hemácias, e durante a realização do trabalho diversos técnicos cooperaram na feitura e distribuição dos reagentes.

Fac. Med. de Ribeirão Prêto — Dep. de Microbiologia e Imunologia (Prof. J. O. de Almeida) e Dep. de Parasitologia (Prof. M. P. Barreto). Trabalho realizado com auxílio financeiro do Convênio entre o Ministério da Saúde (D.N.E.Ru.) e a Secretaria da Saúde Pública e da Assistência Social do Estado de São Paulo.

(1) Prof. de Microbiologia e Imunologia.
(2) Assistente de Parasitologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Os elementos da reação, antígeno, sôro, complemento, hemácias e hemolisina foram preparados de acôrdo com a técnica descrita anteriormente por FREITAS & ALMEIDA [4].

Soros que reagiram na prova com 3 unidades de complemento e que se tinham mostrado destituídos de propriedades anticomplementares, foram retomados para o teste de comparação de reações, de acôrdo com a técnica a seguir descrita:

a) Diluir o sôro reagente em solução fisiológica, nas seguintes proporções: 1:1 — 1:1,3 — 1:1,8 — 1:2,4 — 1:3,2 — 1:4,2 — 1:5,6 e 1:7,5.

b) Distribuir sôro diluído, antígeno e complemento, empregando 0,05 ml para o primeiro, uma dose de reatividade paralela [2] para o antígeno e 3,6 unidades de complemento. Os volumes são completados para 0,3 ml. Fazer duas séries iguais, empregando os mesmos elementos.

c) Incubar a 37°C por 90 minutos. Juntar então 0,2 ml de hemácias ótimamente sensibilizadas, incubar de novo por 15 minutos, juntar 0,5 ml de solução fisiológica gelada a todos os tubos. Centrifugar e ler os sobrenadantes, em colorímetro foto-elétrico, com filtro $\lambda = 545$.

RESULTADOS

As reações são feitas simultâneamente e em paralelo, usando-se para as reações em duplicata o mesmo antígeno, na mesma diluição.

Os resultados das reações são dados em têrmos de G ou grau de reação, de acôrdo com o Quadro I construído para o sistema moléstia de Chagas, quando se empregam 3,6 unidades de complemento.

QUADRO I

Valores dos graus de reatividade com 3,6 unidades de complemento

$$h = 0{,}20$$

$$G = \log D\ (K'_{S,A} - 1) - 0{,}121$$

Hemólise	Fator de diluição *							
	1,0	1,3	1,8	2,4	3,2	4,2	5,6	7,5
10%	0,541	0,655	0,796	0,921	1,046	1,164	1,289	1,416
15%	0,491	0,605	0,746	0,871	0,996	1,114	1,239	1,366
20%	0,453	0,567	0,708	0,833	0,958	1,076	1,201	1,328
25%	0,421	0,535	0,676	0,801	0,926	1,044	1,169	1,296
30%	0,392	0,506	0,647	0,772	0,897	1,015	1,140	1,267
35%	0,366	0,480	0,621	0,746	0,871	0,989	1,114	1,241
40%	0,341	0,455	0,596	0,721	0,846	0,964	1,089	1,216
45%	0,318	0,432	0,573	0,698	0,823	0,941	1,066	1,193
50%	0,294	0,408	0,549	0,674	0,799	0,917	1,042	1,169
55%	0,270	0,384	0,525	0,650	0,775	0,893	1,018	1,145
60%	0,244	0,358	0,499	0,624	0,749	0,867	0,992	1,119
65%	0,217	0,331	0,472	0,597	0,722	0,840	0,965	1,092
70%	0,189	0,303	0,444	0,569	0,694	0,812	0,937	1,064
75%	0,155	0,269	0,410	0,535	0,660	0,778	0,903	1,030
80%	0,117	0,231	0,372	0,497	0,622	0,740	0,865	0,992
85%	0,067	0,181	0,322	0,447	0,572	0,690	0,815	0,942
90%	0,000	0,114	0,255	0,380	0,505	0,623	0,748	0,875

* Adicionar uma unidade aos valores de G correspondentes, quando o fator de diluição for 10 vêzes aquêle encontrado no quadro.

G para dado sôro é o valor máximo achado, desde que não difira de outro valor de G mais que 0,110. Se os valores mais próximos de G apresentam diferença igual ou maior que 0,110 ou quando a reação não nos dá nenhum valor para G, ela então é classificada de *inadmissível.*

Dessa forma, cada sôro nos fornecerá dois valores de G, um para cada série de tubos de par de reações simultâneas e paralelas. Êsses dois G formam uma *observação admissível.* Uma observação admissível é considerada defeituosa se apresentar uma diferença igual ou maior que 0,070 entre os valores de G.

O uso de G foi proposto por ALMEIDA & THOMPSON [3] como equivalente ao uso de T, definido como:

$$T = D(K'_{S,A} - 1)$$

onde

T = título do sôro

D = fator de diluição

$K'_{S,A}$ = unidades de complemento para 50% quando sôro reage com antígeno.

A relação entre T e G no sistema moléstia de Chagas é:

$$G = \log (K'_{S,A} - 1) - 0{,}121$$

A discrepância entre os títulos, da primeira e segunda reação, foi calculada como a diferença entre G (ou ΔG), substituindo R, definido anteriormente como:

$$R = 2(T_1 - T_2)/(T_1 + T_2)$$

A relação entre G e R é aproximadamente:

$$R \cong 2{,}303\ (\Delta G)$$

A substituição de R por G tem a vantagem de simplificar a avaliação das discrepâncias entre as reatividades encontradas nas duas séries de reações simultâneas e em duplicata.

De um total de 311 pares de reações, 12 foram inadmissíveis; as 299 observações restantes foram examinadas, segundo os critérios adotados anteriormente por THOMPSON & SILVERSTEIN [12] e por THOMPSON & ALMEIDA [11]. No presente trabalho não nos esforçamos para dar maior cuidado à distribuição dos reagentes, preferindo antes nos utilizarmos de diferentes técnicos, reproduzindo exatamente as condições normais de trabalho, em um laboratório de rotina, onde se faz eventualmente o rodízio de auxiliares em sorologia. Òbviamente podemos considerar que falhas poderão ocorrer por imprecisão de técnica e a experimentação neste trabalho pôde demonstrar até que ponto elas podem afetar o resultado de uma reação, partindo do princípio de que as discrepâncias entre pares de reações simultâneas sòmente poderiam provir de erros técnicos.

Para evitar qualquer efeito de correlação nesta amostra de 311 soros, nós evitamos fazer mais de 10 reações por dia. Obtivemos assim um conjunto de 299 valores de ΔG que foram tratados como se êles tivessem sido retirados por acaso de um número infinito de observações possíveis. O gráfico 1 tem por ordenadas as freqüências acumuladas e em abscissas valores de ΔG. A curva de freqüência acumulada foi construída por métodos estatísticos desenvolvidos por THOMPSON [8, 9, 10] quando apresentou os processos para determinar os intervalos de confiança para a mediana e outros valores, na expectativa de que a forma de distribuição do atributo fôsse desconhecida. Os valores de ΔG foram numerados de 1 a 299 em ordem de magnitude não decrescente; a freqüência relativa de ΔG foi calculada como $pk = k/(n + 1)$, onde pk é a freqüência

relativa, k é o número de observação na série arrumada de n observações.

O gráfico 1 é formado de pontos que são juntados por uma linha ùnicamente para dar uma idéia da magnitude dos pontos intermediários. Os intervalos de confiança ali indicados por linhas horizontais para várias percentagens de probabilidade acumulada, foram calculados por métodos estatísticos que possuem o mesmo fundamento que o sistema de análise seqüêncial de probabilidade direta (MALTANER & THOMPSON [5], PANGBORN & col.[6]). Nesse método é inteiramente desnecessário que a variável ΔG tenha a distribuição de freqüência normal convencional. Em contraste com os métodos estatísticos baseados na distribuição normal, a forma de inferência chamada de distribuição livre ou não-paramétrica não exige o cálculo da variância.

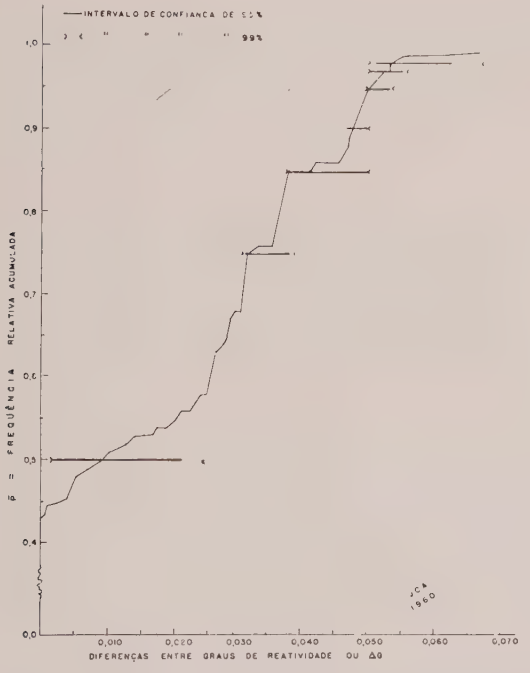


Fig. 1 — Gráfico de probabilidade acumulada de Δ G.

No presente trabalho nos utilizamos de tabelas construídas por THOMPSON [12] para a análise de dados de reprodutibilidade de reações de fixação de complemento com cardiolipina (THOMPSON & SILVERSTEIN [12]). THOMPSON [8, 9, 10] desenvolveu métodos para o cálculo do intervalo de confiança para atributos com forma de distribuição desconhecida. Os mesmos princípios foram apresentados quase concomitantemente por SAVUR [7] em 1937.

O cálculo dos limites do intervalo de confiança central se faz diretamente pelo quadro II para os percentis de 2, 5, 10, 15, 25 e 50, que dá os valores numéricos da ordem pela qual as observações foram arranjadas.

Para os percentis maiores que 50, o cálculo é feito pela relação $q \equiv 1 - p$:

$$P_{100p,n,k} \equiv 1 - P_{100q,n,n+1-k}$$

onde

$$X_{n+1-k}$$

é o têrmo k em ordem de magnitude decrescente.

Assim o intervalo de confiança a 95% para o percentil de 90 ficará entre dois valores:

$$X_{300-k} \quad \text{para} \quad P_{10,299,k} \geq 0{,}975$$

$$X_{300-k'} \quad \text{para} \quad P_{10,299,k'} \leq 0{,}025$$

O quadro II dá os valores: de 41 para k e 20 para k'.

Então

$$X_{300-41} = X_{259}$$

$$X_{300-20} = X_{280}$$

Os limites de confiança corresponderão aos valores de ΔG das observações n.^{os} 259 e 280. O quadro III nos dá então 0,047 e 0,050.

Um outro exemplo pode ser dado no cálculo do intervalo central de confiança a 99% para o percentil 75.

QUADRO II

Valores de k para os percentis de dois, cinco, dez, quinze, vinte e cinco e cinqüenta, para n = 299, segundo a relação desenvolvida por Thompson (1936):

$$P_{100p,n,k} \equiv 1 - P_{100q,n,n+1-k}$$

k	$P_{2,299,k}$
1	0,00238011
2	0,01690363
3	0,06106696
4	0,15029494
5	0,28504740
6	0,44730035
7	0,60955330
8	0,74815423
9	0,85139777
10	0,91952446
11	0,95984434
12	0,98146297
13	0,99205169
14	0,99682244
15	0,99881140
16	0,99958264
17	0,99986201
18	0,99995693
19	0,99998727
20	0,99999643
21	0,99999905
22	0,99999976
23	0,99999994
24	0,99999999

k	$P_{3,299,k}$
28	0,99999985
29	0,99999996
30	0,99999999
31	1,00000000

k	$P_{5,299,k}$
1	0,00000022
2	0,00000366
3	0,00003062
4	0,00017109
5	0,00071819
6	0,00241708
7	0,00679844
8	0,01645061
9	0,03499293
10	0,06654740
11	0,11470950
12	0,18130684
13	0,26542980
14	0,36317592
15	0,46827136
16	0,57336681
17	0,67154808

k	$P_{10,299,k}$
7	0,00000004
8	0,00000091
9	0,00000091
10	0,00000342
11	0,00001149
12	0,00003505
13	0,00009789
14	0,00025202
15	0,00060188
16	0,00134047
17	0,00279713
18	0,00549148
19	0,01018163
20	0,01788885
21	0,02987786
22	0,04757592
23	0,07242472
24	0,10567648
25	0,14816485
26	0,20009508
27	0,26090227
28	0,32921652
29	0,40295253
30	0,47951369
31	0,55607484

k	$P_{10,299,k}$
63	0,99999999
64	1,0000000

k	$P_{15,299,k}$
14	0,00000000
15	0,00000001
16	0,00000004
17	0,00000013
18	0,00000040
19	0,00000113
20	0,00000304
21	0,00000777
22	0,00001886
23	0,00004359
24	0,00009614
25	0,00020280
26	0,00040983
27	0,00079486
28	0,00148186
29	0,00265959
30	0,00460176
31	0,00768638
32	0,01240989
33	0,01939097

k	$P_{15,299,k}$
64	0,99808517
65	0,99881300
66	0,99927736
67	0,99956790
68	0,99974620
69	0,99985355
70	0,99991697
71	0,99995375
72	0,99997468
73	0,99998638
74	0,99999279
75	0,99999625
76	0,99999808
77	0,99999904
78	0,99999952
79	0,99999977
80	0,99999989
81	0,99999995
82	0,99999998
83	0,99999999
84	1,00000000

k	$P_{25,299,k}$
35	0,00000000

k	$P_{25,299,k}$
66	0,10713849
67	0,13467342
68	0,16659203
69	0,20289162
70	0,24339986
71	0,28776602
72	0,33546486
73	0,38581363
74	0,43800163
75	0,49112995
76	0,54425827
77	0,59645451
78	0,64684310
79	0,69464765
80	0,73922489
81	0,78008736
82	0,81691403
83	0,84954905
84	0,87999001
85	0,90236797
86	0,92292194
87	0,93997059
88	0,95388385
89	0,96505661

k	$P_{25,299,k}$
119	0,99999999
120	1,00000000

k	$P_{50,299,k}$
150	0,50000000
151	0,54602751
152	0,59144539
153	0,63566806
154	0,67815651
155	0,71843777
156	0,75612024
157	0,79090405
158	0,82258612
159	0,85105989
160	0,87631020
161	0,89840423
161	0,91747920
163	0,93372824
164	0,94738542
165	0,95871088
166	0,96797717
167	0,97545718
168	0,98141432
169	0,98609493
170	0,98972309

25	1,00000000

k	$P_{3,299,k}$
1	0,00011085
2	0,00113596
3	0,00585991
4	0,02032395
5	0,05342723
6	0,11383218
7	0,20537370
8	0,32387886
9	0,45765529
10	0,59143172
11	0,71141677
12	0,80891165
13	0,88127899
14	0,93069079
15	0,96190973
16	0,98025488
17	0,99032580
18	0,99551089
19	0,99802325
20	0,99917242
21	0,99967000
22	0,99987445
23	0,99995436
24	0,99998412
25	0,99999470
26	0,99999831
27	0,99999948

18	0,75757068
19	0,82850159
20	0,88371375
21	0,92439639
22	0,95284365
23	0,97176312
24	0,98375555
25	0,99101412
26	0,99521646
27	0,99754731
28	0,99878770
29	0,99942189
30	0,99973380
31	0,99988155
32	0,99994903
33	0,99997877
34	0,99999144
35	0,99999665
36	0,99999873
37	0,99999953
38	0,99999983
39	0,99999994
40	0,99999998
41	0,99999999
42	1,00000000

k	$P_{10,299,k}$
5	0,00000000
6	0,00000001

32	0,62989186
33	0,69858270
34	0,76033507
35	0,81401524
36	0,85917474
37	0,89597138
38	0,92503298
39	0,94729655
40	0,96385152
41	0,97580788
42	0,98420001
43	0,98992798
44	0,99373182
45	0,99619087
46	0,99773916
47	0,99868906
48	0,99925723
49	0,99958865
50	0,99977729
51	0,99988208
52	0,99993893
53	0,99996906
54	0,99998466
55	0,99999253
56	0,99999646
57	0,99999835
58	0,99999925
59	0,99999967
60	0,99999985
61	0,99999994
62	0,99999997

34	0,02935860
35	0,04312014
36	0,06150740
37	0,08530269
38	0,11515082
39	0,15146760
40	0,19435755
41	0,24355484
42	0,29839888
43	0,35785167
44	0,42055768
45	0,48494033
46	0,54932297
47	0,61205900
48	0,67165431
49	0,72686760
50	0,77677830
51	0,82081715
52	0,85876066
53	0,89069502
54	0,91695846
55	0,93807220
56	0,95466964
57	0,96743153
58	0,97703258
59	0,98410192
60	0,98919776
61	0,99279483
62	0,99528190
63	0,99696669

36	0,00000001
37	0,00000002
38	0,00000005
39	0,00000011
40	0,00000025
41	0,00000056
42	0,00000121
43	0,00000243
44	0,00000507
45	0,00001018
46	0,00001985
47	0,00003763
48	0,00006955
49	0,00012539
50	0,00022075
51	0,00037969
52	0,00063834
53	0,00104954
54	0,00168832
55	0,00265832
56	0,00409862
57	0,00619048
58	0,00916313
59	0,01329750
60	0,01892678
61	0,02643249
62	0,03623504
63	0,04877808
64	0,06450665
65	0,08383969

90	0,97388603
91	0,98075336
92	0,98601076
93	0,98997286
94	0,99291248
95	0,99505987
96	0,99660448
97	0,99769857
98	0,99846181
99	0,99898621
100	0,99934111
101	0,99957771
102	0,99973310
103	0,99983364
104	0,99989775
105	0,99993802
106	0,99996294
107	0,99997815
108	0,99998730
109	0,99999271
110	0,99999588
111	0,99999770
112	0,99999874
113	0,99999931
114	0,99999963
115	0,99999981
116	0,99999990
117	0,99999995
118	0,99999998

171	0,99249757
172	0,99459060
173	0,99614820
174	0,99729164
175	0,99811965
176	0,99871108
177	0,99912778
178	0,99941734
179	0,99961581
180	0,99974997
181	0,99983941
182	0,99989821
183	0,99993634
184	0,99996071
185	0,99997608
186	0,99998563
187	0,99999149
188	0,99999502
189	0,99999713
190	0,99999837
191	0,99999909
192	0,99999949
193	0,99999972
194	0,00090085
195	0,99999992
196	0,99999996
197	0,99999998
198	0,99999999
199	0,99999999
200	1,00000000

QUADRO III

Arranjo das 299 observações por ordem não decrescente de Δ G.

k	Δ G	k/(n+1)	k	Δ G	k/(n+1)
1 — 130	0,000	43,33	196 — 202	0,029	67,33
131 — 134	0,001	44,67	203 — 204	0,030	68,00
135 — 136	0,003	45,33	205	0,031	68,33
137	0,004	45,67	206 — 224	0,032	74,67
138 — 143	0,005	47,67	225 — 227	0,034	75,67
144 — 148	0,007	49,33	228	0,037	76,00
149	0,008	49,67	229 — 254	0,038	84,67
150 — 153	0,010	51,00	255	0,040	85,00
154	0,013	51,33	256	0,041	85,33
155 — 157	0,014	52,33	257	0,042	85,67
158	0,015	52,67	258	0,044	86,00
159	0,016	53,00	259	0,047	86,33
160 — 161	0,017	53,67	260 — 265	0,048	88,33
162 — 163	0,018	54,33	266	0,049	88,67
164 — 165	0,020	55,00	267 — 286	0,050	95,33
166 — 167	0,021	55,67	287 — 288	0,051	96,00
168 — 169	0,022	56,33	289 — 290	0,052	96,67
170 — 173	0,023	57,67	291 — 293	0,053	97,67
174 — 175	0,024	58,33	294	0,054	98,00
176 — 179	0,025	59,67	295 — 296	0,055	98,67
180 — 190	0,026	63,33	297	0,056	99,00
191	0,027	63,67	298	0,062	99,33
194 — 195	0,028	65,00	299	0,067	99,67

De acôrdo com o quadro II, calculamos k para 100 — 75 = 25.

Então

$$P_{25,299,k'} \leq 0{,}005 < P_{25,299,k'+1}$$

Então

$$k' = 56 \quad \text{e}$$

$$n + 1 - k \equiv 300 - 56 = 244$$

e do mesmo modo

$$P_{25,299,k} \geq 0{,}995 > P_{25,299,k-1}$$

Então

$$k = 95 \quad \text{e}$$

$$n + 1 - k = 300 - 95 = 205$$

O intervalo é dado pelos valores de ΔG correspondentes às observações 205 e 244, e que são respectivamente 0,031 e 0,038.

Dessa forma foram calculados os intervalos de confiança em têrmos de ΔG para os percentis 50, 75, 85, 90, 95, 97 e 98 (Fig. 1, Quadro IV).

QUADRO IV

Intervalos centrais para 95% e 99% de confiança de probabilidade

n = 299

Percentil k/(n+1)	Limites do intervalo de confiança em ΔG para: 95%	99%
50	0,001 — 0,021	<0,000 — 0,023
75	0,032 — 0,038	0,031 — 0,038
85	0,038 — 0,050	0,038 — 0,050
90	0,047 — 0,050	0,040 — 0,050
95	0,050 — 0,053	0,050 — 0,053
97	0,050 — 0,055	0,050 — 0,056
98	0,051 — 0,062	0,050 — 0,067

Os resultados obtidos nesse ensaio, no sistema moléstia de Chagas, indicam que a reatividade do complexo antígeno-anticorpo, em reações em duplicata e simultâneas, pode ser avaliada com uma discrepância menor que aquela que define uma reação defeituosa. As discrepâncias avaliadas em têrmos de ΔG indicam a variabilidade da medida, uma vez que os mesmos elementos foram utilizados. A noção de que erros acumulados em um e outro sentido possam dar aos valores de reatividade sérica, discrepâncias que se distribuem de um modo não paramétrico, é de grande valia, uma vez que podemos calcular a própria variação do método, em uma observação feita, como parte integrante de um universo de tôdas as observações possíveis.

CONCLUSÕES

Os erros introduzidos na reação de Guerreiro-Machado, por imprecisão na distribuição dos reagentes, leitura da reação e cálculo da reatividade específica, não foram maiores que os observados em outros sistemas como sífilis e lepra.

A presente investigação demonstra que os mesmos critérios adotados na comparação de antígenos de cardiolipina e fosfolipídeos de bacilo da tuberculose podem ser válidos para antígenos aparentemente menos uniformes, como é o antígeno preparado de *Trypanosoma cruzi* pelo método de FREITAS & ALMEIDA [4].

Assim, as discrepâncias de reações simultâneas e paralelas, feitas com os mesmos elementos, serão toleráveis desde que estejam compreendidas entre os limites estabelecidos.

Na comparação de um antígeno com outro tomado como padrão, podemos empregar o método de análise seqüencial de probabilidade direta, que se baseia nos resultados das discrepâncias obtidas. Dêste modo, as observações defeituosas poderão ser imputadas ao reagente em prova e não a imprecisões provenientes de erros técnicos na feitura da reação.

Tais considerações mostram que não se deve procurar alterar os critérios de aceitabilidade de antígenos, antes de se demonstrar que o método por si só não introduz variação maior do que aquela esperada.

SUMMARY

Study on the relative discrepancy between pairs of simultaneous complement-fixation reactions for Chagas' disease.

Sera from Chagas' disease patients were tested with *Trypanosoma cruzi* antigens by complement fixation procedures used for testing cardiolipin, but using 3.6 units of complement. The same antigen preparation was used in pairs of simultaneous replicate complement-fixation tests. The experience with 311 observation-pairs of reactions yielded 12 inadmissible observations and the remaining 299 observations showed 153 with G-differences less than 0.010 numerically, 204 with such differences less than 0.030 and 299 with differences less than 0.070.

Table for calculation of G was constructed for the Chagas' system by methods described elsewhere. This would indicate an expectation that about 3.82% of observations would be inadmissible and the remaining observations with G-differences less than 0.070 which defines a defective observation.

Our present results indicate that we should expect a far lower frequency of defectives than that set as a tolerable incidence. Indeed, by these data, we can admit that the conditions for testing Chagas' antigen are not different from those prevailing in other systems, like syphilis or leprosy. This report provides a basis for the evaluation of the technical variability of the quantitative complement fixation method for determination of the specific reactivity of the immune complex.

Several tables are appended, giving the essential data arranged as required for the purposes of the statistical analysis, and also some of the confidence intervals as estimated by distribution-free inference.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J. O. — Preparo, padronização e comparação de antígenos em reações quantitativas de fixação do complemento em sô-

ro de doentes de lepra. Rev. brasil. Leprol. 26:181-271, 1958.

2. ALMEIDA, J. O.; FREITAS, J. L. P. & SIQUEIRA, A. F. — Capacidade reativa especifica do antígeno com anticorpo em reações de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1:266-272, 1959.

3. ALMEIDA, J. O. & THOMPSON, W. R. — Streamlined tests of cardiopilin antigen components for specificity and sensitivity in complement-fixation reactions. Ann. Rep. Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1954. p. 31-32.

4. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Hospital, Rio de Janeiro 35:787-800, 1949.

5. MALTANER, E. & THOMPSON, W. R. — Application of direct probability sequential analysis to acceptance or rejection of antigens for complement fixation tests for syphilis. Research Rep. May 11, 1945, Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1948. [Mimeogr.; obtido por pedido aos autores.]

6. PANGBORN, M. C.; ALMEIDA, J. O.; MALTANER, F.; SILVERSTEIN, A. M. & THOMPSON, W. R. — Cardiolipin antigens; preparation and chemical and serological control. 2nd ed. W.H.O. Monogr. Ser. nº 6, 1955.

7. SAVUR, S. R. — The use of the median in tests of significance. Proc. Indian Acad. Sc. 5.564-576, 1937.

8. THOMPSON, W. R. — Assumption economy in scientific statistical analysis. Trabalho apresentado à reunião de 17-5-1949 da American Society of Bacteriologists, em Cincinnati. [Cópias obtidas do autor.]

9. THOMPSON, W. R. — Biological applications of normal range and associated significance tests in ignorance of original distribution forms. Ann. math. Statist. 9:281-287, 1938.

10. THOMPSON, W. R. — On confidence ranges for the median and other expectation distributions for populations of unknown distribution form. Ann. math. Statist. 7:122-128, 1936.

11. THOMPSON, W. R. & ALMEIDA, J. O. — Sequential tests of antigen components; influence of technical variability and or producer aim. Ann. Rep. Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1955. p. 35-36.

12. THOMPSON, W. R. & SILVERSTEIN, A. M. — Study of relative discrepancy between pairs of simultaneous replicate complement-fixation tests with cardiolipin antigens. Research Rep. June 21, 1954, Div. Lab. & Research, New York State Dep. Health, 1954. [Mimeogr.; obtido por pedido aos autores.]

Recebido para publicação em 6 agôsto 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):213-217, julho-agôsto 1960

A REAÇÃO INTRADÉRMICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

II. Observações sôbre a estabilidade de antígenos de cercária e verme adulto

J. Pellegrino e J. M. Pompeu Memoria

RESUMO

Seis grupos de pacientes com esquistossomose mansoni ativa foram injetados, por via intradérmica, com diferentes partidas de antígenos de cercária e verme adulto (*S. mansoni*) recentemente preparadas ou depois de mantidas na geladeira por um período que variou de 4 meses a 2 anos e 6 meses. Mesmo utilizando-se a medida das áreas das pápulas produzidas 15 minutos após a injeção dos antígenos, como critério de interpretação dos resultados fornecidos pelo teste cutâneo, não foi evidenciada diminuição, estatìsticamente significativa, da atividade dos antígenos relacionada com a conservação dos mesmos, na geladeira.

INTRODUÇÃO

Observações feitas por diversos autores sôbre a conservação de antígenos usados em testes intradérmicos para o diagnóstico da esquistossomose têm demonstrado que a estabilidade do material alergênico é muito grande. Assim, Pratt & Oliver-Gonzalez [12] não observaram nenhuma perda da "potência" de diversas partidas de antígenos de cercária de *S. mansoni*, mantidas na geladeira por períodos até 12 meses. A resultados semelhantes chegaram Mayer & Pifano [5] e Coutinho [2] com o emprêgo de antígeno de esquistossomos adultos (*S. mansoni*) e Martins [4] usando antígeno de hepatopâncreas de moluscos infectados com formas evolutivas dêste helminto. Blair & Ross [1] referem que uma partida de antígeno de miracídio de *S. haematobium* conservou suas propriedades depois de mantida à temperatura ambiente por 7 anos e uma partida de antígeno de cercária dêste parasita mostrou-se ativa mesmo depois de ficar exposta diàriamente à luz solar pelo período de 1 ano. Segundo Lurie & Meillon [3], antígenos de cercária conservaram-se inalterados em sua atividade após permanecerem 3 anos em geladeira ou 6 meses à temperatura ambiente. A única referência, ao que nos consta, de perda de atividade, foi feita por Pesigan & col.[11]. Êstes autores, trabalhando com antígeno de *S. japonicum* (verme adulto), observaram ligeiro decréscimo de sua "potência", após 3 meses.

No presente trabalho serão relatadas observações por nós coligidas sôbre a estabilidade de antígenos de cercária e verme adulto (*S. mansoni*). Nestas observações adotou-se como critério de leitura da reação intradérmica, a medida da área da pápula formada 15 minutos após a injeção do antígeno (Pellegrino & Macedo [6]). Pensamos que com esta técnica pequenas alterações da atividade antigênica poderiam ser evidenciadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos de esquistossomose. — Os seguintes grupos de indivíduos com exame de fezes positivo para ovos de *S. mansoni* foram incluídos no presente trabalho:

Inst. Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte e Inst. de Biologia, Fac. de Filosofia da Univ. Minas Gerais, Brasil.

Grupo A: 25 adultos não selecionados, do sexo masculino. Êstes pacientes foram injetados na mesma ocasião, por via intradérmica, com duas partidas de antígeno de cercária: uma de preparação recente (C_9) e outro preparada há 8 meses e conservada na geladeira (C_4). Os antígenos foram empregados nas seguintes diluições: 1:1.000; 1:10.000 e 1:100.000.

Grupo B: 25 adultos não selecionados, do sexo masculino. Foram empregadas neste grupo duas partidas de antígeno de verme adulto: uma de preparação recente (V_9) e outra preparada há 8 meses e conservada na geladeira (V_4). As reações intradérmicas foram feitas na mesma ocasião, nos 25 pacientes, com as seguintes diluições dos antígenos: 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000.

Grupo C: 17 meninos, com 10 a 15 anos de idade, e que haviam reagido, prèviamente, à injeção intradérmica de antígeno de verme adulto a 1:1.000, com pápulas de 1,4 a 1,8 cm^2. Neste grupo foram empregadas três partidas de antígeno de verme adulto: partida V_{15}, de preparação recente; partida V_{14}, conservada 4 meses na geladeira e partida V_4, preparada há 2 anos e 5 meses e conservada na geladeira. Os antígenos foram empregados na diluição de 1:1.000.

Grupo D: 15 pacientes não selecionados, do sexo masculino, com 15 a 18 anos de idade. Foram empregadas neste grupo as seguintes partidas de antígeno de verme adulto: V_{12}, de preparação recente, a partir de esquistossomos recentemente dessecados; V_{11}, de preparação recente, mas com esquistossomos dessecados há 1 ano e conservados à temperatura ambiente em ampola fechada sob vácuo; V_4, preparada há 1 ano e 6 meses e conservada na geladeira. Os antígenos foram usados a 1:1.000.

Grupo E: 25 pacientes adultos, do sexo masculino, receberam injeção intradérmica de antígeno de cercária (partida C_4) e, 2 anos e 6 meses depois, a reação intradérmica foi repetida nos mesmos pacientes, com o mesmo antígeno. Durante êste período o antígeno foi conservado na geladeira. Concentração do antígeno, 1:1.000.

Grupo F: 15 pacientes adultos, do sexo masculino, foram injetados, por via intradérmica, com antígeno de verme adulto (partida V_4, concentração 1:1.000). Dois anos e 6 meses depois, a reação intradérmica foi repetida, com o mesmo antígeno, nos mesmos indivíduos. Durante êste período o antígeno foi mantido na geladeira.

Antígenos. — Cercárias e esquistossomos adultos (*S. mansoni*) foram obtidos de acôrdo com técnicas já descritas (Pellegrino & Nunes [9]; Pellegrino & Siqueira [10]). Os antígenos de cercária e verme adulto foram preparados a partir do material dessecado segundo descrição feita no primeiro trabalho desta série (Pellegrino & Memoria [7]). Os antígenos foram utilizados na concentração de 1:1.000, em relação ao pêso do material dessecado. Nos grupos A e B, diluições de 1:10.000 e de 1:100.000 foram também empregadas. Quando não em uso, os antígenos foram conservados na geladeira (4° a 10°C).

Reação intradérmica. — As reações intradérmicas foram feitas na parte média da face flexora dos antebraços, tendo-se injetado 0,05 ml de cada antígeno com seringa BD de 0,25 ml, munida de agulha adequada. Nos grupos A e B foi feita prévia casualização em relação aos antígenos e locais do antebraço. A leitura dos resultados foi feita após 15 minutos, tendo-se determinado as áreas das pápulas nos decalques tomados em papel absorvente, ligeiramente umedecido, após delimitar com tinta o seu contôrno (Pellegrino & Macedo [6]).

Análise estatística. — Nos grupos A e B foi feito o estudo da regressão das áreas das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações dos antígenos. A análise de variância foi usada em todos os grupos estudados.

RESULTADOS

No grupo A, a análise estatística revelou que a regressão linear explica totalmente a relação entre as áreas médias das pápulas e os logaritmos das concentrações dos antígenos C_9, de preparação recente, e C_4, conservado 8 meses na geladeira. A análise

conjunta revelou que uma única reta explica a relação entre as áreas e as concentrações (Fig. 1), sendo expressa pela equação: $\hat{y} = 3{,}58 + 0{,}50\ x$. As áreas médias obtidas com os antígenos C_4 e C_9, nas diversas concentrações, e o êrro padrão das médias estão representados no Quadro I.

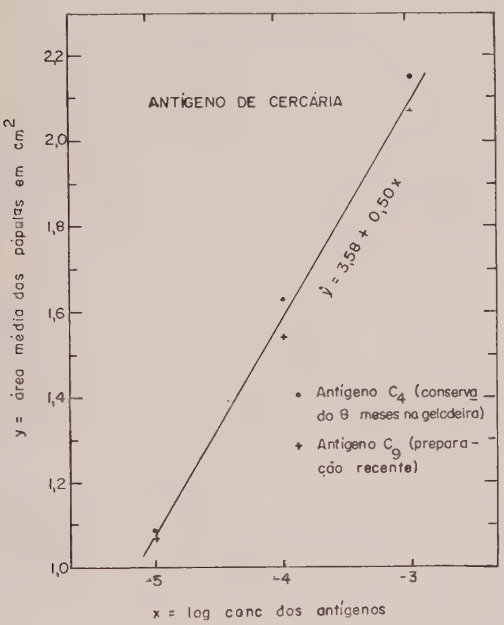

ANTÍGENO DE CERCÁRIA
y = área média das pápulas em cm2
x = log conc dos antígenos
ŷ = 3,58 + 0,50x
Antígeno C4 (conservado 8 meses na geladeira)
Antígeno C9 (preparação recente)

Fig. 1 — Regressão linear conjunta das áreas médias das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações de duas partidas de antígeno de cercária: C_9, preparada recentemente, e C_4, conservada 8 meses na geladeira.

No grupo B foram obtidos resultados semelhantes ao grupo A. A análise estatística mostrou que uma única reta (Fig. 2) explica a relação entre as áreas e as concentrações dos antígenos V_9 (preparação recente) e V_4 (conservado na geladeira por 8 meses). A equação correspondente a esta reta é a seguinte: $\hat{y} = 3{,}37 + 0{,}44\ x$. As áreas médias obtidas para as diferentes concentrações dos antígenos V_4 e V_9, bem como o êrro padrão das médias, estão expressos no Quadro I.

Nos grupos C e D não houve diferença estatìsticamente significativa entre as médias obtidas (Quadro I).

No grupo de 25 adultos não selecionados nos quais a reação intradérmica foi repetida 2 anos e 6 meses depois, com a mesma partida de antígeno de cercária (C_4), a análise estatística mostrou que a diferença entre as áreas médias obtidas nas duas ocasiões não foi estatìsticamente significativa (Grupo E, Quadro I). O mesmo foi verificado no Grupo F, utilizando-se antígeno de verme adulto.

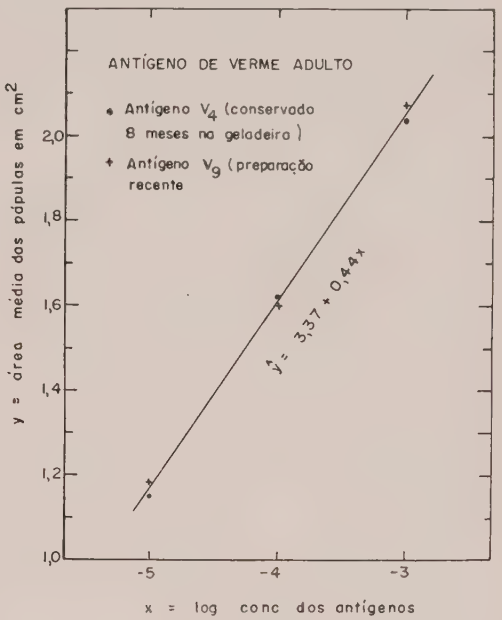

ANTÍGENO DE VERME ADULTO
y = área média das pápulas em cm2
x = log conc dos antígenos
ŷ = 3,37 + 0,44x
Antígeno V4 (conservado 8 meses na geladeira)
Antígeno V9 (preparação recente)

Fig. 2 — Regressão linear conjunta das áreas médias das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações de duas partidas de antígeno de verme adulto: V_9, preparada recentemente, e V_4, conservada 8 meses na geladeira.

DISCUSSÃO

Mesmo utilizando-nos de um critério acurado e objetivo para interpretar os resultados fornecidos pela reação intradérmica, não conseguimos evidenciar diminuição da atividade de antígenos de cercária e verme adulto (*S. mansoni*), conservados na geladeira por períodos até 2 anos e 6 meses (tempo máximo de observação). Ficam, portanto, confirmadas as observações sôbre a estabilidade de antígenos usados para o diagnóstico da esquistossomose pela reação intradérmica, já citadas na introdução dêste trabalho. Mostramos também que se pode conservar o material dessecado, à temperatura ambiente, em ampola fechada sob vácuo e que o antígeno pode ser preparado quando se tornar necessário (partida V_{11}, Grupo D).

PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:213-217, 1960.

QUADRO I

Reação intradérmica na esquistossomose. Área média das pápulas (cm²) e êrro padrão das médias obtidos em diversos grupos de pacientes com esquistossomose.

Grupos de pacientes	Antigenos			Área média das pápulas (cm²) nas diluições de			Êrro padrão da média
	Extraído de:	Partida	Observações	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
A	Cercária	C 9	Preparação recente	2,02	1,54	1,07	± 0,04
	Cercária	C 4	Conservada 8 meses na geladeira	2,15	1,63	1,09	± 0,07
B	Verme adulto	V 9	Preparação recente	2,07	1,60	1,18	± 0,03
	Verme adulto	V 4	Conservada 8 meses na geladeira	2,03	1,62	1,15	± 0,03
C	Verme adulto	V 15	Preparação recente	1,58	...	...	± 0,06
	Verme adulto	V 14	Conservada 4 meses na geladeira	1,55	...	...	0,06
	Verme adulto	V 4	Conservada 29 meses na geladeira	1,68	...	...	± 0,06
D	Verme adulto	V 12	Preparação recente	1,65	...	...	± 0,05
	Verme adulto	V 11	Vermes dessecados há 12 meses	1,51	...	...	± 0,05
	Verme adulto	V 4	Conservada 18 meses na geladeira	1,69	...	...	± 0,05
E	Cercária	C 4	—	2,16	...	...	± 0,05
	Cercária	C 4	Reações repetidas 30 meses após	2,12	...	...	± 0,05
F	Verme adulto	V 4	—	1,82	...	...	± 0,06
	Verme adulto	V 4	Reações repetidas 30 meses após	1,82	...	...	± 0,06

Um exame atento do Quadro I mostra que resultados muito semelhantes foram obtidos com os antígenos de cercária e verme adulto (Grupos A e B), confirmando observações por nós descritas em relação a êstes dois antígenos (PELLEGRINO & MEMORIA [7]). No Grupo D, constituído por pacientes de 15 a 18 anos, não selecionados, as áreas médias observadas foram nìtidamente inferiores àquelas verificadas nos Grupos A, B, E e F, integrados por adultos não selecionados. A influência da idade sôbre os resultados fornecidos pela reação intradérmica, praticada em pacientes com esquistossomose mansoni já foi referida em trabalho anterior (PELLEGRINO, MEMORIA & MACEDO [8]).

SUMMARY

The intradermal test in schistosomiasis mansoni. II. Observations on the stability of cercarial and adult worm antigens.

Six groups of patients with active schistosomiasis mansoni were intradermally injected with different batches of cercarial and adult worm antigens of *S. mansoni*. Antigens stored in the refrigerator (4° to 10°C) for periods from 4 months to 2½ years were compared with freshly prepared antigens. The results of the intradermal tests were assessed by measuring the wheal areas 15 minutes after the injection of the antigens. No decrease of the activity of the antigens was detected even after 2½ years of storage. It was concluded that the allergenic material in *S. mansoni* extracts, able to elicit cutaneous response in infected patients is very stable.

REFERÊNCIAS

1. BLAIR, D. M. & ROSS, W. F. — Observations on the use of cercarial antigen in the diagnosis of schistosomiasis. Ann. trop. Med. & Parasitol. **42**:46-51, 1948.

2. COUTINHO, J. O. — Contribuição ao estudo da esquistossomose mansônica no Estado da Bahia, Brasil. Arq. Hig. & Saúde públ., São Paulo **16**:3-40, 1951.

3. LURIE, H. I. & DE MEILLON, B. — Skin tests for schistosomiasis. South African med. J. **25**:321-324, 1951.

4. MARTINS, A. V. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni. Belo Horizonte, 1949. Tese Fac. Med. Univ. Minas Gerais.

5. MAYER, M. & PIFANO, F. — El diagnostico de la schistosomiasis por intradermorreacciones con un antigeno preparado de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Rev. Sanid. Asist. Social **10**:3-44, 1945.

6. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:499-509, 1956.

7. PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. I. Ensaios comparativos com antígenos de cercária, verme adulto, ôvo e miracídio. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**: 171-176, 1960.

8. PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. & MACEDO, D. G. — Quantitative aspects of the intradermic test with cercarial antigen in schistosomiasis. J. Parasitol. **43**:304-307, 1957.

9. PELLEGRINO, J. & NUNES, R. M. B. — Técnica de obtenção de cercárias dessecadas de *Schistosoma mansoni* para o preparo de antígenos. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:397-404, 1956.

10. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. — Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:589-597, 1956.

11. PESIGAN, T. P.; PUTONG, P. B.; GARCIA, E. G. & MILLAR, C. A. — Intradermal test for schistosomiasis japonica. Preliminary report. J. Philippine med. Assoc. **27**:212-219, 1951.

12. PRATT, C. K. & OLIVER-GONZALEZ, J. — Intradermal reactions to fresh and stored antigens prepared from cercariae of *Schistosoma mansoni*. Puerto Rico J. publ. Health & trop. Med. **22**:254-256, 1947.

Recebido para publicação em 6 junho 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):218-223, julho-agôsto 1960

A REAÇÃO INTRADÉRMICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

III. Influência da idade, sexo, côr e local da reação

J. Pellegrino e J. M. Pompeu Memoria

RESUMO

A influência da idade, sexo, côr e local da reação intradérmica foi estudada em 607 pacientes com esquistossomose mansoni, utilizando-se antígenos de cercária e verme adulto (*S. mansoni*). Verificou-se que a reação intradérmica foi mais intensa em adultos do que em crianças e que as mulheres reagiram menos intensamente do que os homens.

Os indivíduos de côr preta reagiram mais intensamente aos antígenos de cercária e verme adulto do que os de côr parda e branca.

Quando a reação intradérmica foi praticada no dorso, as pápulas apresentaram áreas maiores do que no antebraço e braço. Em vista dêsses resultados, os autores sugerem que o dorso seja o local preferido para se fazer a reação intradérmica nas mulheres e crianças: em adultos do sexo masculino, resultados satisfatórios são também obtidos quando a reação é praticada no antebraço.

INTRODUÇÃO

Nas primeiras publicações desta série (Pellegrino & Memoria [5, 6]), demos a conhecer os resultados de um estudo comparativo feito com antígenos de cercária, verme adulto, ôvo e miracídio de *S. mansoni*, bem como observações sôbre a estabilidade de antígenos de cercária e verme adulto.

No presente trabalho serão relatadas observações sôbre a influência da idade, sexo, côr e local da injeção intradérmica sôbre os resultados obtidos com o teste cutâneo em pacientes com esquistossomose mansoni.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos de esquistossomose. — Nos seguintes grupos de pacientes, com exame de fezes positivo para ovos de *S. mansoni*, foram feitas as nossas observações:

Grupo A: A *influência da idade* sôbre os resultados da reação intradérmica foi investigada em um grupo de 250 pacientes do sexo masculino, sendo 100 com 10 a 15 anos de idade, 50 com 16 a 19 anos e 100 com 20 a 40 anos. Nestes pacientes foi usado antígeno de cercária (*S. mansoni*) nas seguintes diluições: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-7}.

Grupo B: A *influência do sexo* foi estudada em um grupo de 100 pacientes, com 20 a 50 anos de idade, sendo 50 homens e 50 mulheres. O nível econômico-social era homogêneo e a maioria era constituída por indivíduos de côr branca ou parda. A reação intradérmica foi praticada com antígenos de cercária e verme adulto, ambos na diluição de 1:1.000.

Grupo C: A *influência da côr, em adultos*, foi investigada em 150 pacientes do sexo masculino, com 20 a 50 anos de idade, sendo 50 de côr preta, 50 de côr branca e 50 de côr parda. Foram utilizados antígenos de cercária e verme adulto, a 1:1.000.

Inst. Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte e Inst. de Biologia, Fac. de Filosofia da Univ. Minas Gerais, Brasil.

Grupo D: A *influência da côr, em crianças*, foi estudada em um grupo de 89 meninos de 10 a 15 anos de idade, sendo 31 de côr branca, 32 de côr parda e 26 de côr preta. Foi utilizado antígeno de verme adulto a 1:1.000, tendo sido feitas as reações intradérmicas na mesma ocasião, no antebraço e no dorso, em todos os meninos.

Grupo E: A *influência do local da reação intradérmica* (antebraço, braço e dorso), foi estudada em um grupo de 20 meninos, com 10 a 12 anos de idade. Foi usado, neste grupo, antígeno de cercária a 1:1.000.

Antígenos. — Antígenos de cercária e verme adulto (*S. mansoni*) foram preparados de acôrdo com técnica descrita no primeiro trabalho desta série (PELLEGRINO & MEMORIA [5]). A concentração de 1:1.000, em relação ao pêso do material dessecado (cercárias ou esquistossomos adultos), foi adotada em todos os grupos. No Grupo A, o antígeno de cercária foi usado nas seguintes diluições: 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-7}.

Reação intradérmica. — Em todos os grupos a reação intradérmica foi feita na face flexora do antebraço. No Grupo D a reação foi feita no antebraço e no dorso (região interescapular). No Grupo E, além do antebraço e dorso, a reação intradérmica foi praticada também no braço (região deltoideana). Injetou-se 0,05 ml de cada antígeno com seringa BD de 0,25 ml, munida de agulha adequada. No Grupo A foi feita prévia casualização em relação aos locais da reação, em ambos os antebraços. A leitura dos resultados foi feita após 15 minutos, tendo-se determinado as áreas das pápulas nos decalques tomados em papel absorvente, ligeiramente umedecido, após delimitar com tinta o seu contôrno (PELLEGRINO & MACEDO [4]). Foram consideradas positivas as reações com pápulas de 1,2 cm^2 ou mais, e negativas aquelas com pápulas até 0,9 cm^2. Resultados intermediários (1,0 e 1,1 cm^2) foram considerados duvidosos.

Análise estatística. — A análise de variância foi usada em todos os grupos estudados. Além disso, no Grupo A foi feito o estudo da regressão das áreas das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações do antígeno de cercária.

RESULTADOS

Os dados contidos no Quadro I, correspondentes aos resultados obtidos no Grupo A, indicam claramente que a reação intradérmica é mais intensa em adultos (20 anos ou mais) do que em crianças (10 a 15

QUADRO I

Resultados da reação intradérmica (com antígeno de cercária) segundo a concentração do antígeno e os grupos etários; área média das pápulas e percentagens de reações positivas em 100 pacientes com 10-15 anos, 50 com 16-19 anos e 100 com 20 ou mais anos.

Concentrações do antígeno	Grupos de idade					
	10-15 anos		16-19 anos		20 anos ou mais	
	Área média das pápulas (cm^2)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm^2)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm^2)	% de reações positivas
10^{-7}	0,56	—	0,63	—	0,66	*1*
10^{-6}	0,63	*1*	0,85	*22*	0,92	*26*
10^{-5}	0,91	*18*	1,27	*52*	1,39	*63*
10^{-4}	1,22	*51*	1,61	*62*	1,76	*82*
10^{-3}	1,54	*79*	1,95	*90*	2,20	*96*
Êrro padrão das médias	± 0,03		± 0,05		± 0,04	

anos). Resultados intermediários foram obtidos no grupo de pacientes com 16 a 19 anos. O estudo da regressão das áreas das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações mostrou que existe uma relação linear, nos 3 grupos de idade, entre as áreas médias e os logaritmos das concentrações do antígeno (Fig. 1). As equações encontradas para as retas, relativas aos 3 grupos de idade, foram as seguintes:

Grupo de idade 10-15 anos:

$$\hat{y} = 2{,}44 + 0{,}30\,x$$

Grupo de idade 16-19 anos:

$$\hat{y} = 3{,}04 + 0{,}36\,x$$

Grupo de idade 20 anos ou mais:

$$\hat{y} = 3{,}46 + 0{,}42\,x$$

Para as diversas concentrações do antígeno, a percentagem de reações positivas foi maior no grupo de adultos. Assim, para a concentração de 1:1.000, habitualmente usada para os testes intradérmicos, as percentagens de positividade foram, respectivamente, de 79%, 90% e 96%, para as crianças (10-15 anos), pacientes com 16 a 19 anos e para os adultos (20 anos ou mais).

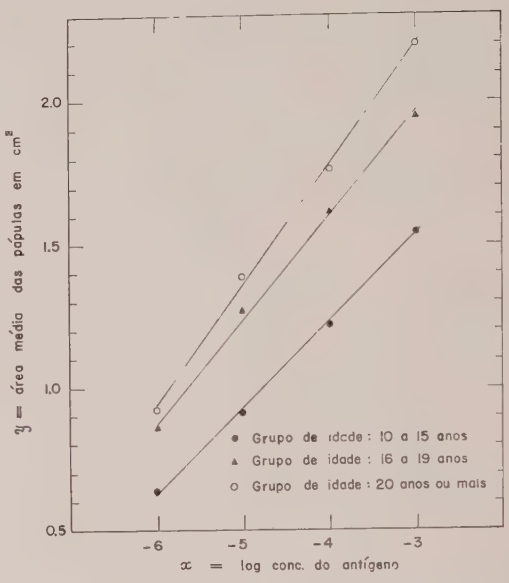


Fig. 1 — Influência da idade sôbre os resultados obtidos com a reação intradérmica em pacientes com esquistossomose mansoni. Regressão da área média das pápulas (cm²) em relação ao logaritmo das concentrações do antígeno de cercária.

ferença entre as percentagens de reações positivas foi igualmente muito marcante (Quadro II).

QUADRO II

Resultados da reação intradérmica (com antígeno de cercária e com antígeno de verme adulto a 1:1000), segundo o sexo; área média das pápulas e percentagem de reações positivas em 50 homens e 50 mulheres com esquistossomose.

Antígenos	Homens		Mulheres		Êrro padrão das médias
	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	
Cercária	1,91	*88*	1,40	*66*	± 0,10
Verme adulto ..	2,16	*80*	1,52	*60*	± 0,14

No Grupo B, os homens apresentaram reações mais intensas do que as mulheres. A diferença entre as médias foi estatìsticamente significativa ao nível de 0,1% de probabilidade, tanto com o antígeno de cercária quanto com o de verme adulto. A di-

Os resultados obtidos no Grupo C (influência da côr em adultos), acham-se resumidos no Quadro III. A análise estatística mostrou que as diferenças entre as médias obtidas com o antígeno de cercária foram significativas ao nível de 5% de pro-

QUADRO III

Resultados da reação intradérmica (com antígeno de cercária e com antígeno de verme adulto, a 1:1000) em três grupos de 50 pacientes adultos, segundo a côr; área média das pápulas e percentagem de reações positivas.

Antígeno	Brancos		Pretos		Pardos		Êrro padrão das médias
	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	
Cercária	1,87	*92*	2,25	*96*	1,90	*84*	± 0,12
Verme adulto	1,81	*92*	2,06	*96*	1,85	*84*	± 0,09

babilidade. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos de côr branca e parda. Já com o antígeno de verme adulto, as diferenças entre as médias ($F = 3,67$) não chegaram a alcançar o nível de significância de 5% ($F = 3,94$). Mesmo assim pode-se observar, pelo Quadro III, que a maior média correspondeu ao grupo de prêtos (2,06), seguindo-se a dos pardos (1,85) e brancos (1,81).

Os dados relativos ao Grupo D (influência da côr, em meninos), acham-se resumidos no Quadro IV. Nas reações feitas no antebraço, as diferenças entre as áreas médias foram significativas ao nível de 1% de probabilidade. No dorso as diferenças entre as médias foram ainda mais evidentes (diferença estatìsticamente significativa ao nível de 0,1%). Portanto, nos meninos de côr preta, as reações foram mais intensas, tanto no antebraço como no dorso.

O Quadro V resume os resultados obtidos no Grupo E (influência do local da reação). A análise estatística mostrou que as diferenças entre as médias obtidas foram estatìsticamente significativas ao nível de 0,1% de probabilidade. Entretanto não houve diferença estatìsticamente significativa entre as médias obtidas no antebraço e braço.

DISCUSSÃO

Os resultados da reação intradérmica no diagnóstico da esquistossomose mansoni são grandemente influenciados pela idade dos pacientes. As reações são mais intensas em adultos, decorrendo daí menor sensibilidade do teste cutâneo quando praticado em crianças. Embora seja em geral admitido que a reação intradérmica proporcione resultados positivos em cêrca de 90% dos pacientes infectados com *S. mansoni* (cf. PELLE-

QUADRO IV

Resultados da reação intradérmica (com antígenos de verme adulto a 1:1000), segundo a côr, em 31 meninos de côr branca, 26 de côr prêta e 32 de côr parda; áreas médias das pápulas e percentagens de reações positivas.

Local da reação	Brancos		Pretos		Pardos		Êrro padrão das médias
	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	Área média das pápulas (cm²)	% de reações positivas	
Antebraço	0,97	*35,5*	1,51	*69,2*	1,25	*53,1*	± 0,12
Dorso	1,27	*58,1*	2,17	*76,9*	1,83	*78,1*	± 0,16

QUADRO V

Resultados da reação intradérmica (com antígeno de verme de adulto, a 1:1000), segundo o local da reação, em 20 meninos com esquistossomose; área média das pápulas e percentagem de positivos.

Local da reação	Resultados	
	Área média das pápulas (cm^2)	% de reações positivas
Antebraço	1,17	*70*
Braço	1,36	*65*
Dorso	2,06	*90*
Êrro padrão das médias	± 0,10	

GRINO [3]), um exame atento da literatura mostra que em crianças as percentagens de positividade são inferiores a esta cifra: TAVARES DA SILVA [10], 45,6%; MARTINS [1], 78,2% com antígeno de cercária e 83,3% com antígeno de verme adulto; PESSÔA & BARROS [9], 87,5%; PELLEGRINO & MACEDO [4], 79%. Os dados incluídos no Quadro I e Fig. 1 (em parte publicados, PELLEGRINO, MEMORIA & MACEDO [7]) mostram claramente que as reações são mais intensas em adultos, confirmando as observações de vários autores (MAYER & PIFANO [2]; MARTINS [1]; PESSÔA & BARROS [9]; W. H. O.[11]). Como demonstraram PELLEGRINO & col.[8], a sensibilidade do teste cutâneo em crianças pode ser melhorada, praticando-se a reação intradérmica no dorso. O Quadro V mostra que a reação intradérmica praticada com o mesmo antígeno, na mesma ocasião, num grupo de 20 meninos, forneceu as seguintes percentagens de positividade: 65% para o braço, 70% para o antebraço e 90% para o dorso. É interessante observar que quando a reação intradérmica é praticada no dorso de crianças com esquistossomose, as áreas médias obtidas se assemelham àquelas verificadas em adultos.

Foi igualmente muito acentuada a influência do sexo sôbre os resultados da reação intradérmica. Enquanto que num grupo de 50 homens com esquistossomose as áreas médias observadas foram, respectivamente, de 1,91 e 2,16 cm^2 para os antígenos de cercária e verme adulto, as áreas médias obtidas com os mesmos antígenos num grupo de 50 mulherem foram de 1,40 e 1,52 cm^2. É interessante salientar que os resultados obtidos em mulheres se assemelham àqueles verificados em meninos de 10 a 15 anos. É possível que em mulheres, assim como foi demonstrado para crianças, a sensibilidade do teste possa ser aumentada, praticando-se a reação no dorso. O fato de que nas mulheres as reações são menos intensas, já havia sido assinalado por MARTINS [1].

Os nossos dados mostram também que nos indivíduos de côr preta as reações são mais intensas, o que está de acôrdo com as observações de Martins [1].

Como já foi assinalado, o local em que a reação intradérmica é praticada (face flexora do antebraço, região deltoideana, região interescapular) tem influência sôbre os resultados. Como a reação intradérmica é mais intensa no dorso e como nas mulheres e crianças a sensibilidade do teste cutâneo é relativamente baixa, convém que a reação seja praticada nessa região. Em adultos do sexo masculino, resultados satisfatórios são também obtidos quando a reação é praticada no antebraço.

Em resumo, a idade, o sexo, a côr do paciente e o local em que a reação intradérmica é praticada exercem decisiva influência sôbre os resultados obtidos. A reação é menos intensa em crianças e mulheres e os indivíduos de côr preta tendem a reagir mais intensamente à injeção intradérmica do antígeno específico. Em mulheres e crianças o dorso deve ser o local preferido para a reação intradérmica.

SUMMARY

The intradermal test in schistosomiasis mansoni. III. Influence of age, sex and color of the patients and local of the test on the results.

To study the influence of age, sex, and color of the patients, as well as that of the site where the test was performed on the results obtained, 607 patients with schistosomiasis mansoni were skin tested with cercarial adult worm (*S. mansoni*) antigens.

The cutaneous response was stronger in adults than in children, and also stronger in men than in women. Negroes react more intensely than other people.

The mean wheal area observed after the performance of the cutaneous test on the inter-scapular region was significantly larger than those from tests carried out on the arm or forearm. The back should then be preferred when performing tests on women and children. In male adults, satisfactory results are also obtained when the test is performed on the forearm.

REFERÊNCIAS

1. MARTINS, A. V. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni. Belo Horizonte, 1959. Tese Fac. Med. Univ. Minas Gerais.

2. MAYER, M. & PIFANO, F. — El diagnóstico de rotina de la schistosomiasis mansoni por la intradermorreacción y la reacción de Fairley en la campaña anti-bilharziana. Conf. sanit. panamer., XII, Caracas, 1947. p. 18-22.

3. PELLEGRINO, J. — Diagnóstico das esquistossomoses pela reação intradérmica. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **9**:105-121, 1957.

4. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:499-509, 1956.

5. PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. I. Ensaios comparativos com antígenos de cercária, verme adulto, ôvo e miracídio. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**: 171-176, 1960.

6. PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. II. Observações sôbre a estabilidade de antígenos de cercária e verme adulto. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**:213-217, 1960.

7. PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. & MACEDO, D. G. — Quantitative aspects of the intradermic test with cercarial antigen in schistosomiasis. J. Parasitol. **43**:304-307, 1957.

8. PELLEGRINO, J.; REZENDE, C. L.; MEMORIA, J. M. P.; MOURÃO, O. G. & BRENER, Z. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni na criança. J. Pediat. **24**:211-230, 1959.

9. PESSÔA, S. & BARROS, P. R. — Sôbre o diagnóstico da esquistossomose mansoni na infância, pela intradermo-reação com antígeno de esquistossomos adultos. Hospital, Rio de Janeiro **43**:19-25, 1953.

10. SILVA, L. C. T. da — Estudo médico-cirúrgico da esquistossomíase de Manson. Recife, 1945. Tese Fac. Med. Univ. Recife.

11. WORLD HEALTH ORGANIZATION. EXPERT COMMITTEE ON BILHARZIASIS. First report. W.H.O. tech. Rept. Ser. (65), 1953.

Recebido para publicação em 11 julho 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):224-229, julho-agôsto 1960

CHEMOTHERAPY OF EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS

III. Comparative drug activity of some antimonial compounds in mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*

Z. Brener

SUMMARY

The comparative drug activity of some antimonial compounds in mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni* was determined using sodium antimony III bis-pyrocatechol 3:5 disulphonate ("Fouadin"), lithium antimony III thiomalate ("Anthiomaline"), potassium antimony III tartrate (tartar emetic), sodium antimonyl III gluconate ("Triostib"), antimonyl III EDTA and antimony III dimercapto succinate (TWSb). A perfusion technique was used for recovering the worms and the CD50 (dose which clears from worms 50 per cent of the treated mice) and the RD90 (dose which kills 90 per cent of the worms in the treated mice) were graphically determined through the probit method. Two therapeutic indexes — LD50:CD50 and LD50:RD90 — were obtained. "Fouadin" presented the highest indexes but in general the therapeutic indexes of the antimonial compounds were low and no great differences were detected.

INTRODUCTION

In spite of the actual existence of many active antimonial compounds, most of them in the market, only a few data have been published concerning the determination of their therapeutic indexes in experimental schistosomiasis. Although there may be some criticism on the applicability to man of experimental results, there is some evidence that this quantitative estimation of the drug activity may be applied to human therapeutics. Other data, such as the correlation between drug activity, toxicity and antimony contents of the different compounds may also be determined this way.

A comparison of the efficacy of some active antimonial drugs has been carried out by Bang & Hairston [1] in guinea-pigs experimentally infected with *Schistosoma japonicum;* a ratio based on the number of worms in the controls and treated animals was determined. A therapeutic index based in the ratio of the LD50 to the CD50 (dose which clears half of the mice from worms) was used by Schubert, Goldberg & Schreiber [7] in the study of some antimonial compounds on mice infected with *S. mansoni.* Standen [9], also using *S. mansoni,* employed the hepatic shift accumulating 75 per cent or more of the female worms (HS 75) as a critical dose and reported the critical levels of tartar emetic and sodium antimony gluconate needed to give HS 75 in a single dose. Berberian, Dennis & Freele [2], studying Miracil D and some related thiaxanthones

Inst. Nacional de Endemias Rurais — Centro de Pesquisas de Belo Horizonte, Brasil.

in mice infected with *S. mansoni*, determined a therapeutic index derived as the ratio of the ED50 (dose calculated through the probit method to kill 50 per cent of the worms) to the calculated 5-day LD50. HILL [6], also with experimental mansoni infections, used two therapeutic ratios, the LD50:CD50 and LD50:CD95, CD50 and CD95 being the doses that cure respectively 50 and 95 per cent of the mice.

The comparative activity of some antimonial compounds on mice experimentally infected with *S. mansoni* is reported in this paper, along with a discussion about the methods and techniques used for the determination of therapeutic indexes in experimental schistosomiasis.

MATERIAL AND METHODS

Infection of animals: mice were infected through cutaneous route with 100 cercariae. The general procedure was similar to that described by STANDEN [10]: mice weighing 16-18 g were infected, individually, in glass specimen-pars containing the suspension of living cercariae. To avoid the deleterious action of urine and faeces on the cercariae, the animals, prior to the infection, are allowed to stay in lukewarm water for 15 minutes in order to eliminate their excretion. The mice are exposed to the cercariae for 30 minutes and are intensively illuminated by lamps during their immersion in the water. About 20 per cent of cercariae develop into adult worms and practically 100 per cent of the surviving mice get infected.

Drugs used:

a) sodium antimony III bis-pyrocatechol 3:5 disulphonate ("Fouadin" Bayer);

b) lithium antimony III thiomalate ("Anthiomaline" Rhodia);

c) potassium antimony III tartrate or tartar emetic (crystalline sample);

d) sodium antimonyl III gluconate ("Triostib" Burroughs Wellcome);

e) antimonyl III EDTA (crystalline sample);

f) antimony III dimercapto succinate, sodium salt (TWSb/6, Hoffman La Roche) and potassium salt ("Sulfantimon", Fontoura-Wyeth).

Toxicity: mice weighing 18-20 g were used for the tests. All drugs were administered through intraperitoneal route, in the same volume, and mortality observed for 3 days. The LD50 was determined graphically by the probit method.

Assessment of drug activity: the infected mice were divided into groups of about 30 animals and the drugs administered intraperitoneally in doses differing from each other by a constant factor. The drugs were injected once a day for 5 consecutive days in two series starting respectively on the 35^{th} and 45^{th} days of infection. The mice were sacrificed 7 days after the last dose and the living worms recovered through perfusion of the liver and mesenteric veins following a modified technique described by BUTTNER [3].

The CD50 (dose which clears from worms 50 per cent of the treated mice) and the RD90 (dose which kills 90 per cent of the worms in the treated mice) are graphically determined from the logarithms of the doses and the probits of the percentages of cure and worm reduction. Two therapeutic indexes, LD50:CD50 and LD50:RD90 are obtained.

RESULTS

The results obtained from the determination of toxicity and therapeutic activity are shown in Table 1. As the Sb contents of each compound are different, the same data were expressed, in Table 2, as milligrams of Sb III per kilogram. Fig. 1 shows the results obtained from the determination of the CD50 and RD90 with "Fouadin".

TABLE I

Therapeutic indexes obtained with antimony compounds in mice experimentally infected with *S. mansoni*.

Drug	% Sb	LD_{50} (mg/Kgm)	CD_{50} (mg/Kgm)	RD_{90} (mg/Kgm)	LD_{50}:CD_{50} (mg/Kgm)	LD_{50}:RD_{90} (mg/Kgm)
Sodium antimony III bis pyrocatechol 3:5 disulphonate (Fouadin).	13.5	1.120	370	350	3.0	3.2
Sodium antimonyl III gluconate ("Triostib").	30.0	115	70	68	1.8	1.6
Antimonyl III EDTA.	27.0	85	44	41	1.9	2.0
Lithium antimony III thiomalate ("Anthiomaline").	16.0	110	72	72	1.5	1.5
Potassium antimony III tartrate (Tartar emetic).	39.0	48	20	24	2.4	2.0

TABLE 2

Therapeutic indexes obtained with antimony compounds in mice experimentally infected with *S. mansoni*. Results expressed as mg of Sb III per Kilogram.

Drug	LD_{50} (Sb mg/Kgm)	CD_{50} (Sb mg/Kgm)	RD_{90} (Sb mg/Kgm)
Sodium antimony III bis pyrocatechol 3:5 disulphonate (Fouadin).	151	49	47
Sodium antimonyl III gluconate ("Triostib").	34	21	20
Antimony III EDTA.	22	11	11
Lithium antimony III thiomalate ("Anthiomaline").	17	11	11
Potassium antimony III tartrate (Tartar emetic).	18	7	9

In the experiences performed with antimony dimercapto succinate (TW Sb), in the doses of 300, 600 and 900 mg/Kg, no cures were observed in spite of a marked shift of the worms to the liver and a reduction of about 50% of the worm population in the series treated with the higher dose.

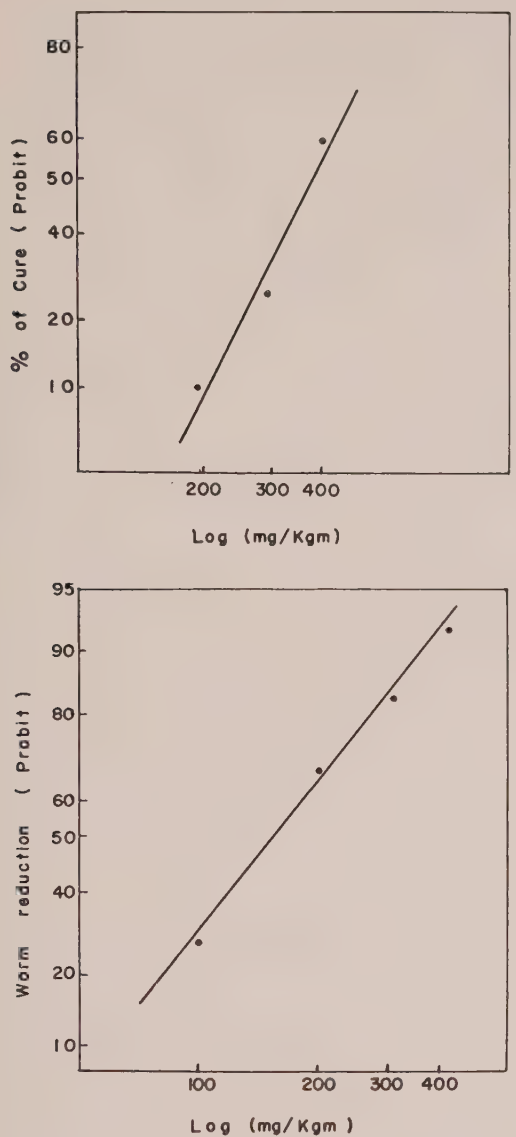


Fig. 1 — CD50 and RD90 in mice infected with S. mansoni *and treated with sodium antimony III bis-pyrocatechol 3:5 disulphonate ("Fouadin").*

DISCUSSION

For the assessment of drug activity in the case of the determination of comparative therapeutic indexes in experimental schistosomiasis, we need a reliable method for recovering living worms. Using the liver crush technique, a major trouble lies in the difficulty to distinguish the dead worms from living ones (STANDEN [9]). When, however, the sifht toward the liver is taken as a criterion for evaluating the drug comparative activity, it is not necessary to take into consideration whether the worms are dead or alive. This method, nevertheless, is used only to determine the initial effect of the drugs (STANDEN [7]) and, therefore, their healing action can merely be presumed from those data. The utilization of a perfusion technique permits the recovery of all living *S. mansoni;* worms already ensheathed by inflammatory tissue in the liver are not recovered. Previous experiences with treated animals showed that there was no significant difference between the number of worms obtained through perfusion on the 7th and 14th day after treatment.

The schedule of treatment was made in such a way as to avoid strong cumulative action and high mortality. With a two series schedule, a high percentage of cures and of worm reduction can be obtained.

Considering the great variation in the number of worms in mice infected with *S. mansoni*, even in untreated animals, indexes based on the percentage of cure seem to be more reliable and the known CD50 was selected. The CD95 used by HILL [6] was not adopted in our work because, at least with antimonial compounds, such and index could be often attained only by extrapolating the data. Following the suggestion of SCHUBERT & GOLDBERG [7], a second therapeutic index was determined based on the ratio of the LD50 to the dose which reduces 90 per cent the number of worms. In our experience the accidental variation in the number of worms in groups of infected mice has never been of such a great magnitude and a reduction of 90 per cent is quite reliable. According to the observations of SCHUBERT & GOLDBERG [7], the determination of the CD50 and RD90 through our method gives also similar results.

Tables 1 and 2 seem to show that the LD50 and the therapeutic values CD50 and RD90 have no correlation with the antimony contents, but that there is some correlation between the LD50 and the CD50 or RD90. It is interesting to remark that GOODWIN [5], studying the toxicity and trypanocidal activity of some organic antimonials, concluded that those two properties were "independent

of antimony content but have some correlation with one another and with the initial rate of excretion of the antimony". A study of the excretion rate of antimony compounds in experimental schistosomiasis would be highly desirable.

The results obtained with TWSb were quite surprising since no cures were achieved by us with such high doses as 900 mg/Kg, the therapeutic response being represented only by a reduction of the worm load. Considering the reported efficacy of this drug on man, such results can not be easily understood. We must emphasize, however, the lack of published data on the action of TWSb in mice experimentally infected with *S. mansoni*. FRIEDHEIM, SILVA & MARTINS [4] refer to data supplied by Luttermoser in guinea-pigs infected with *S. mansoni;* following Luttermoser, 15 per cent of the LD50 of TWSb produces the same reduction of the worms as 38 per cent of the LD50 of "Fouadin".

Due to the lack of extensive comparative studies concerning therapeutical activity of antimonial schistosomicidal agents and considering the diversity of techniques used, an accurate comparison of the therapeutic indexes in experimental schistosomiasis mansoni is rather difficult to be made. SCHUBERT & GOLDBERG [7] and SCHUBERT, GOLDBERG & SCHREIBER [8], using some tri and pentavalent antimonials, concluded that "Fouadin" was the best of the antimonials used with an index 1. Comparing the minimal dose required to shift 75 per cent of *S. mansoni* females to the liver, STANDEN [9] found out that tartar emetic was more active than sodium antimonyl III gluconate. These scarce data are generally in agreement with our figures. From our experience, "Fouadin" presents the highest indexes but, in general, the therapeutic indexes of the antimonial compounds are low and no great difference can be detected in relation to the several compounds tested.

RESUMO

Um estudo comparativo da atividade terapêutica de alguns compostos antimoniais foi realizado em camundongos experimentalmente infectados pelo *Schistosoma mansoni*, usando-se o antimônio-pirocatecol-disulfonato de sódio ("Fuadina"), antimônio tiomalato de lítio ("Antiomaline"), tartarato duplo de potássio e antimônio (tártaro emético), gluconato de sódio e de antimônio ("Triostib"), antimônio III EDTA e antimônio dimercapto succinato de sódio (TWSb). Os vermes eram recuperados através de perfusão do fígado e veias mesentéricas. O CD50 (dose que cura metade dos animais tratados) e o RD90 (dose que reduz em 90% a população de vermes) eram determinados gràficamente por intermédio dos logaritmos das doses e dos probitos das percentagens de curas e redução do número de vermes. Dois índices terapêuticos, LD50:CD50 e LD50:RD90, foram obtidos. A "Fuadina" apresentou os mais altos índices terapêuticos, mas de um modo geral os índices obtidos foram baixos.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his thanks to Prof. Quintino Mingoia and Dr. Marcelo O. A. Corrêa for the antimony III EDTA and to Any Chaia and Egler Chiari for technical help.

REFERENCES

1. BANG, F. B. & HAIRSTON, N. G. — Studies on schistosomiasis japonica. IV. Chemotherapy of experimental schistosomiasis japonica. Amer. J. Hyg. **44**:348-366, 1946.

2. BERBERIAN, D. A.; DENNIS, E. W. & FREELE, H. W. — Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* in Swiss mice. Comp. rend. 5e. Congr. internat. Méd. trop. & Paludisme **2**:292-305, 1953.

3. BUTTNER, A. — Quelques données pratiques et observations sur le cycle evolutif expérimental de *Schistosoma mansoni* (Trématode, Plathelminthe). Bull. Soc. Pathol. éxot. **49**:1197-1211, 1956.

4. FRIEDHEIM, E. A. H.; SILVA, R. J. da & MARTINS, A. V. — Treatment of schistosomiasis mansoni with antimony-a,a'-dimercapto-potassium succinate (TWSb). Amer. J. trop. Med. & Hyg. **3**:714-727, 1954.

5. GOODWIN, L. G. — The toxicity and trypanocidal activity of some organic antimonials. J. Pharmacol. & exper. Therap. **81**: 224-234, 1944.

6. HILL, J. — Chemotherapeutic studies with laboratory infections of *Schistosoma mansoni*. Ann. trop. Med. & Parasitol. **50**:39-48, 1956.

7. SCHUBERT, M. & GOLDBERG, E. — Comparison of therapeutic values of several antimonials in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Fed. Proc. **7**:254, 1948.

8. SCHUBERT, M.; GOLDBERG, E. & SCHREIBER, F. G. — Comparison of several antimonials in the treatment of experimental schistosomiasis mansoni in mice. Amer. J. trop. Med. **29**:115-127, 1949.

9. STANDEN, O. D. — Experimental schistosomiasis. III. Chemotherapy and mode of drug action. Ann. trop. Med. & Parasitol. **47**:26-43, 1953.

10. STANDEN, O. D. — Experimental schistosomiasis. II. Maintenance of *Schistosoma mansoni* in the laboratory, with some notes on experimental infection with *S. hematobium*. Ann. trop. Med. & Parasitol. **43**:268, 1949.

Recebido para publicação em 16 agôsto 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):230-234, julho-agôsto 1960

DERMATOSE SERPIGINOSA NO INTERIOR DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

A. T. Londero [1] e O. Fischman [2]

RESUMO

Os autores estudam 39 casos de dermatose serpiginosa, observados em cidade do interior do Rio Grande do Sul, num período de 2 anos.

Verificaram que:

1) É dermatose comum no interior, longe de praias e de coleções líquidas ou cursos d'água. Há correlação entre o aparecimento da dermatose e as condições climáticas (chuvas e temperatura). Endêmica e estacional, pode apresentar surtos epidêmicos. Os casos surgem ao mesmo tempo, em crianças da mesma família, ou de famílias vizinhas, ocasionalmente em adultos. A localização das lesões depende da postura da criança ao brincar.

2) O gato é o principal hospedeiro do *Ancylostoma braziliense*, disseminando os ovos do verme nos depósitos de areia peridomiciliares, que usa como retrete.

INTRODUÇÃO

Ribeiro [5], Marques [4] e Bopp [1] descreveram casos isolados da dermatose serpiginosa (larva migrans cutânea), ocorridos no Rio Grande do Sul. Campos [2] estudou a incidência da dermatose, nos balneários marítimos do Estado, tendo coligido em 11 anos 25 casos, dos quais 22 de indivíduos infestados nas praias que se estendem de Tôrres a Cassino, a maioria em Cidreira, Capão da Canoa e Arroio do Sal (ver mapa).

Londero & col.[3] descreveram uma epidemia da dermatose, em abril de 1959, em Santa Maria — região da Depressão Central — cidade não situada em margem de coleção ou curso d'água importante.

Bopp, segundo comunicação pessoal, verificou alguns casos de larva migrans cutânea, em Novo Hamburgo e Pôrto Alegre, também cidades da Depressão Central.

Concordam Marques [4], Campos [2] e Londero & col.[3] que a dermatose serpiginosa, no Rio Grande do Sul, tenha como agente etiológico a larva do *Ancylostoma braziliense* Faria, 1910.

Campos [2] julga ser o cão o principal hospedeiro do verme adulto e a areia das praias de mar e de lagoas do Litoral, os locais em que as larvas, preferentemente, se desenvolvem. Bopp chama ainda a atenção para a margem dos córregos que desembocam nas praias, como habitáculos das larvas.

Londero & col.[3] acreditam que, em cidades do interior, o gato seja o principal hospedeiro do verme adulto. Na areia depositada em ruas ou em pátios das casas, as larvas encontram um meio propício ao seu desenvolvimento.

MATERIAL

Consta de 39 pacientes observados durante dois anos (janeiro de 1958 a dezembro de 1959), na cidade de Santa Maria. Dêles, 29 fichados no Laboratório de Zoologia

(1) Prof. de Zoologia e Parasitologia da Fac. Farmácia de Sta. Maria, Univ. do Rio G. do Sul.
(2) Técnica da Cadeira de Zoologia e Parasitologia.

e Parasitologia; 7, gentileza do Dr. P. Lauda; e, 3, gentileza do Prof. Leal de Moraes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As investigações feitas sôbre a origem das infestações demonstraram que elas tiveram lugar nas seguintes localidades: a) uma na praia de Tramandaí; b) uma na vizinha cidade de São Sepé; c) 37 na cidade de Santa Maria (uma em zona suburbana e 36 na zona urbana).

Conforme Campos [2], a dermatose serpiginosa aparece, nas zonas balneárias, de janeiro a abril de cada ano. No interior do Estado, averiguamos a prevalência da der-

Fig. 1 — Mapa do Estado do Rio Grande do Sul, destacando a região da Depressão Central com altitudes inferiores a 200 m, temperatura média 18-20ºC e chuvas de 1.500 a 2.000 mm (em tôdas as estações).

QUADRO I

Distribuição dos casos e localização das lesões de dermatose serpiginosa, observados em Santa Maria, Rio Grande do Sul, segundo os grupos etários.

Grupos etários	Nº de pacientes	Localização das lesões						
		Pé	Perna	Coxa	Nádega	Mão	Antebraço	Tronco
1 a 4 anos ..	20	10	6	5	9	5	2	2
5 a 10 anos ..	13	13	5	—	—	3	2	—
11 ou mais	6	4	1	—	—	1	—	1
Total	39	27	12	5	9	9	4	3

QUADRO II

Pesquisa das fontes de infecção para casos de dermatose serpiginosa no interior do Estado do Rio Grande do Sul.

Grupos	Nº de casos	Areia acumulada nas proximidades			Autópsia de animais domésticos	
		Local e finalidade	Acesso a animais	Isolamento de larvas	Espécie	Vermes isolados
1	4	...	...	...	—	...
2	18	Na rua ou em pátio aberto, para construção ou recreio.	Cães e gatos	...	—	...
3	8	Idem, idem.	Cães e gatos	*A. braziliense*	1 cão	*A. braziliense* (36 fêmeas e 20 machos)
						A. caninum (78 fêmeas e 76 machos)
					1 gato	*A. braziliense* (6 fêmeas e 5 machos)
4	3	Em pátio fechado, de residência, para construção.	Gato	*A. braziliense*	1 gato	*A. braziliense* (79 fêmeas e 60 machos)
						A. caninum (1 fêmea e 1 macho)
5	4	Em pátio fechado, de residência, para recreio.	Gatos	...	—	...
6	1	Idem, idem.	Gatos	*A. braziliense*	—	...

matose, de novembro a maio. Tal período abrange todo o verão, normalmente quente, os dois primeiros meses do outono e os dois últimos da primavera, quando podem ocorrer dias de calor. Em nosso Estado, há chuvas em qualquer estação do ano.

Os casos surgem, em média, 20 dias após chuvas seguidas de fortes calores.

Campos [2] demonstrou que a infestação se dá em 64% dos casos, em crianças menores de 14 anos de idade. Verificamos no interior que 86,4% dos infestados possuem idade inferior a 14 anos.

Em 3 de cada 4 de nossos casos (78,3%) da dermatose serpiginosa o paciente possuía 7 anos ou menos. Isto demonstra cabalmente que a infestação é adquirida na residência ou muito próximo a ela, porque, nesta idade, a criança dificilmente se afasta de casa para brincar. Em segundo lugar, os casos se limitam a crianças de uma mesma família, ou de famílias vizinhas, que costumam brincar juntas. Daí decorre a atenção que voltamos para os depósitos de areia destinados ao brinquedo das crianças, ou usados por elas, quando acumulados para construções.

Como Campos [2], verificamos uma maior predominância de lesões nos membros inferiores.

No grupo etário mais numeroso, crianças de 10 anos ou menos, representando 83,7% do total, é interessante anotar-se que: 1) nas crianças entre 5 a 10 anos de idade: em 100% dos casos, havia lesões nos pés; em 26%, lesões nas mãos; e, em 0%, nas nádegas; 2) nas crianças até 4 anos de idade: em 50% dos casos, lesões nos pés; em 45%, nas nádegas; e, em 25%, nas mãos. As lesões têm uma distribuição regida pela postura, o que depende da idade da criança, ao brincar ou manipular a areia.

Quanto ao local de infestação, o estudo do Quadro II nos mostra que: 1) nos grupos de casos 3, 4 e 6 pudemos isolar as larvas de *Ancylostoma braziliense* da areia onde brincavam as crianças. Tal verificação é importante para os grupos 4 e 6, porque o local de infestação era freqüentado por gatos, nunca por cães; 2) nos grupos de casos 4, 5 e 6 a areia só poderia ter sido infestada por gatos, já que as condições da moradia impediam a penetração de cães ou de outros animais. Em especial, o grupo 4 é importante, porque é composto de três membros de uma mesma família e, o único animal doméstico que possuíam, um gato, sacrificado, demonstrou estar parasitado intensamente pelo *Ancylostoma braziliense*, contra 1 só macho e 1 só fêmea do *A. caninum*.

As verificações acima nos levam a imputar o gato como o principal hospedeiro disseminador de ovos, donde provêm as larvas, agentes da dermatose. No entanto, dois outros fatos falam em favor da asserção: 1) cães e gatos de nossa cidade podem estar infestados pelo *A. braziliense* e pelo *A. caninum*, mas o gato sempre apresenta maior carga de *A. braziliense*, ao passo que, no cão, a carga maior é sempre de *A. caninum* [3]; 2) nunca verificamos casos da dermatose em famílias que passam largas temporadas nas margens arenosas de alguns rios de municípios vizinhos, freqüentadas sòmente por cães.

SUMMARY

Creeping disease in the hinterland of the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

A review of the literature concerning "Creeping eruption" in Rio Grande do Sul (Brazil) was briefly carried out.

In Santa Maria, the study of "Creeping eruption" lasted two years and different points were taken into consideration, such as: 1) About the disease: distribution during two years; localization, age and sex of patients; relationship between the infestation and sandy mounts. 2) About the reservoir of parasites: parasitism in cats and dogs.

It is interesting to observe that:

1) "Creeping eruption" is very common in Santa Maria, hinterland city of Rio Grande do Sul (Brazil), far away from maritime shores, rivers and lagoons. Here, there is an intimate correlation between its frequency and climatic conditions, including tempeartture and rain fall. Occasionally epidemic aspects may be verified, according to exceptional climatic conditions. The infestation was verified among children from the

same family or among children of neighbouring families, incidentally in adults. Children less than 7 years old were more frequently infected. The lesions were localized according to age and comparatively according to postural position of children, while playing. In cities of non-maritime zones, sandy mounts are the place where larvae of *Ancylostoma braziliense* develop quite well and they represent the focus of human infestation.

2) Cats are the chief spreaders of *A. braziliense's* ova, while using sandy mounts as their retrete.

REFERÊNCIAS

1. BOPP, C. — Um caso de larva migrans. An. brasil. Dermat. & Sif. **24**:305, 1949.

2. CAMPOS, E. C. — Larva migrans e sua incidência nos balneários marítimos do Rio Grande do Sul. Rev. Med. Rio Grande do Sul **14**:294-295, 1958.

3. LONDERO, A. T.; FISCHMAN, O.; NETTO, M. V. & MOREIRA, A. R. G. — Considerações sôbre a dermatose serpiginosa (larva migrans cutânea) observada em abril de 1959, em Santa Maria (Rio Grande do Sul). Rev. Assoc. méd. Rio Grande do Sul **3**:127-133, 1959.

4. MARQUES, H. — Um caso de larva migrans. An. brasil. Dermat. & Sif. **21**:233, 1946.

5. RIBEIRO, H. P. — Um caso de larva migrans. Arq. riograd. Med. **15**:378-379, 1936.

Recebido para publicação em 20 julho 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(4):235-242, julho-agôsto 1960

Estudos clínicos

INVESTIGAÇÕES SÔBRE INFECÇÕES CAUSADAS POR VÍRUS DO GRUPO PSITACOSE EM SÃO PAULO

Estudo clínico, radiológico e de laboratório em dois casos de pneumonia intersticial

Raymundo Martins Castro [1], Luiz Augusto Ribeiro do Valle [2], Emil Sabbagga [3]
Hermelino Herbster Gusmão [4]

RESUMO

Os autores apresentam o estudo clínico, radiológico e etiológico de dois casos de pneumonia intersticial.

O primeiro caso refere-se a adulto do sexo masculino com quadro clínico e radiológico dessa síndrome. A reação de fixação do complemento para o grupo de vírus da psitacose realizada no 6.º dia de doença foi negativa na diluição de 1:8. A mesma prova feita em uma outra amostra de sôro, colhida 59 dias após, foi positiva no título de 1:512.

As reações de fixação do complemento para febre Q, de inibição de hemaglutinação para os vírus A, A1 e B de influenza e a pesquisa de crioaglutininas foram negativas.

Êstes resultados permitiram estabelecer, com segurança, ter sido um vírus do grupo da psitacose o causador da moléstia.

Como o paciente tivera contatos ocasionais com aves mantidas em cativeiro, foram elas examinadas. Os resultados das provas sorológicas dêsses animais não permitiram afirmar, de modo categórico, que fôssem êles a fonte primária de infecção, porém não afastaram totalmente essa possibilidade.

O outro caso estudado apresentava quadro clínico e radiológico de pneumonia intersticial grave. A reação de fixação do complemento realizada com amostra única do sôro obtido no 40.º dia da doença foi positiva na diluição de 1:256 em presença de antígeno do grupo de vírus da psitacose. As provas de inibição de hemaglutinação para os vírus A, A1 e B de influenza e a reação de fixação do complemento para febre Q foram ou negativas ou positivas em títulos baixos,

Inst. Med. Trop. São Paulo (Dep. Microb. e Imunol. — Prof. C. S. Lacaz); Inst. Adolfo Lutz (Diret. Microb. e Diag. — Dr. L. S. Gomes); Fac. Hig. Saúde Públ. Univ. São Paulo (Cát Tisiol. — Prof. R. de Paula Souza).

(1) Assistente Inst. Med. Trop. São Paulo; Médico Inst. Adolfo Lutz.

(2) Chefe Secção Virulogia Inst. Adolfo Lutz.

(3) Médico auxiliar de ensino (2ª Clín. Méd. Hosp. Clín).

(4) Livre-Docente Fac. Hig. Saúde Públ.

resultantes provàvelmente de infecção anterior. A pesquisa de crioaglutininas foi positiva ao título de 1:7. A reação de Frei foi negativa. Os dados clínicos, radiológicos e epidemiológicos, juntamente com os resultados das provas sorológicas, são altamente sugestivos de que um vírus do grupo da psitacose tenha sido o agente etiológico da infecção.

INTRODUÇÃO

As infecções humanas e animais pelos vírus do grupo da psitacose vêm sendo estudadas nos últimos 30 anos e, conseqüentemente, têm sido diagnosticados numerosos casos, em diferentes países. Uma revisão e atualização da situação epidemiológica da psitacose, de 1931 a 1956, é encontrada no trabalho de SCHMIDTKE [2].

Na literatura nacional há raras referências a casos de infecções humanas, pulmores, por vírus do grupo da psitacose.

SOUZA [3] descreve um caso clínico, por êle observado, em paciente de Itapetininga (Estado de São Paulo). Tratava-se de uma senhora com quadro de infecção pulmonar grave na qual foi diagnosticada psitacose, por ter estado em contato íntimo com papagaio doente.

MARIANTE [1], no Rio Grande do Sul, refere nova observação de psitacose num caso clìnicamente semelhante ao observado por SOUZA. O diagnóstico, clínico, de psitacose foi feito também por antecedente de contato com papagaio doente.

Em ambos os casos, não foram efetuados exames de laboratório que confirmassem o diagnóstico clínico, quer nos pacientes, quer nas aves.

RIBEIRO DO VALLE & col.[5] tiveram oportunidade de estudar um caso humano de psitacose ocorrido em São Paulo. O paciente tratara de psitacídeos com essa infecção [4]. Do escarro do doente, que apresentava comprometimento pulmonar, foi isolado o vírus da psitacose e as provas de fixação de complemento realizadas ,em amostras sucessivas de sôro, mostravam nítido aumento do nível de anticorpos para os agentes dêsse grupo.

É, sem dúvida, o primeiro caso humano de psitacose, observado no Brasil, cujo diagnóstico foi estabelecido à base de estudos etiológicos. Dada a raridade de relatos dessa natureza, na literatura nacional, resolvemos publicar as duas observações seguintes.

CASO 1 — A. P. D. F., 37 anos, branco, brasileiro, casado, engenheiro, residente em São Paulo, Capital.

História da moléstia atual — Adoeceu, sùbitamente, há sete dias, com mal-estar, arrepios de frio, fraqueza e dor nas pernas. Referia também fotofobia, cansaços físico e mental, tonturas e sensação de sequidão das conjuntivas oculares. Foi verificada nesse dia temperatura de 38ºC. Tomou aspirina com o que melhorou sòmente a dor das pernas. No primeiro dia de moléstia foi examinado por médico, o qual nada encontrou ao exame físico. Nos dias subseqüentes, os cansaços físico e mental acentuaram-se, oscilando a temperatura entre 37 e 38ºC.

No 5º dia de doenpa, tirou radiografia do tórax (fig. 1), fêz hemograma e exame de urina.

Antecedentes — É importante referir que, há três anos, o paciente apresentou quadro doloroso no membro inferior direito e região lombar do mesmo lado, cuja natureza exata não ficou totalmente esclarecida. Posteriormente, teve uma infecção das vias urinárias atribuída à pielografia feita naquela ocasião. Nunca teve moléstia venérea.

Inquirido sôbre contato com animais negou. Alguns dias após lembrou-se que estivera várias vêzes próximo a aves mantidas em cativeiro, em semanas que antecederam seu adoecimento.

Exame físico (feito no 7º dia de doença) — Foi encontrado de positivo sòmente foco de estertores crepitantes 4 a 5 cm abaixo do ângulo inferior do omoplata, localizado no espaço paravertebral direito.

Evolução e terapêutica — No 7º dia de doença, foi feito o diagnóstico provisório de pneumonia atípica, sendo então retirada amostra de sangue, e iniciada terapêutica pelo cloranfenicol 1 g ao dia, por via oral. A temperatura caiu um pouco, permanecendo entre 37,2 e 37,5ºC. Permanência afebril durante alguns dias, mas sempre que abandonava o leito a temperatura recrudescia, não ultrapassando, porém, 37,5ºC. Após um mês de tratamento, feito algo irregularmente, ainda tinha febrícula, e, por essa época, passou a apresentar tosse sêca e ligeira dispnéia de es-

fôrço. O foco de estertores permaneceu audível durante um mês, sendo depois notado na base do hemitórax direito atrito pleural. Após um mês de tratamento pelo cloranfenicol, foi êste substituído por tetraciclina (1 g/dia por 5 dias) e depois por oxitetraciclina, injetável, 100 mg 12/12 horas, por via intramuscular, por 5 dias mais, quando foi então suspensa tôda terapêutica, embora o paciente continuasse a ter febre baixa.

Fig. 1 — Caso A. P. D. F. — Radiografia de 6-6-56. Densificação difusa, de aspecto congestivo-inflamatório, sem limites nítidos, na região paracardíaca direita. Diagnóstico provável: Pneumonia atípica primária. Pneumonite inespecífica.

Fig. 2 — Mesmo caso — Radiografia de 16-7-56. Regressão mais acentuada do processo, restando apenas forte acentuação da trama vaso-brônquica do pólo hilar inferior direito. Em 20-8-56 foi feita nova radiografia para contrôle a qual mostrou regressão total do processo.

Exames subsidiários — Leucograma — 4-6-1956 — Leucócitos: 12.100. Neutrófilos: metamielócitos — 0,0%; bastonetes — 6,0%; segmentados — 55,0%. Eosinófilos: 0,0%. Basófilos: 0,0%. Linfócitos: típicos — 34,0%; leucocitóides — 0,0%; atípicos — 0,0%. Monócitos: 5,0%. Plasmócitos: 0,0%. Numerosas plaquetas. Neutrófilos com granulações tóxicas.

Hemossedimentação: 7 mm (normal até 6 mm). Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no escarro: negativa (3 vêzes).

Estudo radiológico — Durante a evolução da moléstia foram tiradas quatro radiografias do tórax das quais apresentamos a primeira (fig. 1) e a quarta (fig. 2), tiradas respectivamente no 5º e 46º dias de doença, que julgamos suficientes para documentação.

Oitenta dias após o início da moléstia foi feita radiografia de contrôle, a qual mostrou regressão total do processo.

Estudo etiológico — A etiologia do processo pneumônico que acometeu o paciente foi investigada pelas seguintes provas:

1 — Reação de inibição da hemaglutinação para o diagnóstico da influenza, sendo usadas as seguintes estirpes-padrão do vírus: A/PR8, A1/FM1, B/Lee e a amostra A1São Paulo/1/1953, isolada entre nós [6].

2 — Reação de fixação do complemento para o grupo de vírus da psitacose; antígeno preparado com vírus do linfogranuloma venéreo, o qual, dada a existência de antígeno comum fixador do complemento, é correntemente usado para o diagnóstico sorológico da psitacose.

3 — Reação de fixação do complemento para febre Q; antígeno preparado com estirpe Henzerling.

4 — Pesquisa de crioaglutininas, com hemácias humanas do grupo "O".

Os resultados obtidos que permitiram o diagnóstico etiológico da pneumopatia estão condensados no quadro I.

Caso 2 — S. J. S., 20 anos, masculino, solteiro, pardo, servente de pedreiro, procedência imediata — São Paulo. Internado no Hospital das Clínicas em 10-4-1953, inicialmente no Serviço de Pronto Socorro, posteriormente na 3ª Clínica Médica (Serviço do Dr. O. Rodovalho). Alta em 4-5-1953.

História da moléstia atual — Adoeceu há 15 dias, com aparecimento de sensação subjetiva de febre (arrepios de frio, calor pelo corpo e sêde acentuada). Logo após, surgiu tosse, acompanhada de expectoração de mau cheiro e mau gôsto. No início, manifestou-se também fraqueza, de intensidade ràpidamente crescente, o que obrigou o paciente a se recolher ao leito. Houve perda gradual do apetite, chegando à anorexia completa.

O quadro foi, gradativamente, intensificando-se, e, três dias antes da internação, passou a sentir dispnéia, principalmente de decúbito. Durante tôda a evolução da moléstia teve a sensação subjetiva de febre. No 15º dia foi socorrido pelo Pronto Socorro Municipal, sendo removido para o Hospital das Clínicas, onde ficou internado.

Interrogatório — A assinalar: cefaléia, tonturas, astenia e emagrecimento.

Antecedentes — Natural de Tucano, na Bahia, adoeceu poucos dias após sua chegada a São Paulo. No passado mórbido há a referir, de importância, que, um ano antes, teve quadro diagnosticado como pneumonia.

Exame físico — Paciente em regular estado geral. Cianose dos lábios. Decúbito ativo indiferente. P.: 130; PA.: 125x80; Temp.: 39ºC; R.: 40. Tórax, à ausculta estertores bolhosos, disseminados em todo o campo pulmonar.

Evolução e terapêutica — O paciente foi internado e medicado com sôro glicofisiológico, vitaminas, teofilina, oxigênio e penicilina sódica (1.000.000 U.O.), administrada esta juntamente com o sôro por via endovenosa.

Nos dias subseqüentes (11 e 12 de abril) a medicação foi sensìvelmente a mesma, sendo administrada também penicilina-procaína (300.000 U.O. 12/12 horas, por via intramuscular). Com essa medicação houve melhoria discreta do quadro, representada sobretudo por desaparecimento da cianose. O exame físico do tórax permaneceu inalterado; a temperatura, que à admissão era de 39ºC (10-4-1953), atingiu 39,7ºC em 11-4 e 40,0ºC em 12-4. Na manhã de 13-4 foram substituídas a penicilina e a estreptomicina por clortetraciclina (500 mg de 6/6 horas por via oral). No dia seguinte o paciente (14-4) amanheceu afebril, tendo contudo a temperatura, à tarde, ascendido a 38,7ºC. A partir de 15-4 a evolução foi afebril. Quarenta e oito horas após a introdução da clortetraciclina houve normalização da temperatura. O estado geral melhorou ràpidamente, a tosse e os estertores foram também gradativamente diminuindo, havendo normalização da semiologia pulmonar, 25 dias após a internação (40º dia de doença).

A clortetraciclina foi administrada durante 5 dias na dosagem atrás referida (2 g/dia) e por mais 3 dias na dosagem de 1 g por dia (250 mg de 6/6 horas).

Durante a permanência no hospital, quando o paciente já havia melhorado sensìvelmente, foi refeita a anamnese, tendo sido então obtido um dado de grande interêsse, que não fôra anteriormente apurado. Quando o paciente viajou da Bahia para São Paulo (15-20 dias antes de adoecer) trazia em seu ombro um papagaio, o qual durante a viagem adoeceu e morreu. À vista dêsse dado, foi então feito um estudo sorológico numa amostra de sôro obtida na convalescença (quadro I). Nesse, encontrou-se um resultado positivo, na fixação do complemento, para o grupo linfogranuloma-psitacose ao título de 1:256.

QUADRO I

Resultados dos exames sorológicos em 2 casos de pneumonias intersticiais (infecções) causadas por vírus do grupo da psitacose, em São Paulo.

Exames sorológicos	Caso 1			Caso 2
	No 6º dia 1ª amostra	No 19º dia 2ª amostra	No 65º dia 3ª amostra	No 43º dia de doença (amostra única)
Febre Q (R. F. C.)	— (3)	...	— (3)	1/16
Psitacose (R. F. C.)	— (3)	...	1/512	1/256
Influenza (R. I. H.) (vírus A PR/8)	— (4)	...	— (4)	1/64
Influenza (R. I. H.) (vírus A1/ FM 1)	— (4)	...	— (4)	— (4)
Influenza (R. I. H.) (vírus A1/ São Paulo/1/1953)	— (4)	...	— (4)	— (4)
Influenza (R. I. H.) (vírus A1/ São Paulo/2/1953)	...	...	..	— (4)
Influenza (R. I. H.) (vírus B Lee)	— (4)	...	— (4)	— (4)
Crioaglutininas	— (1)	—	—	...
Crioaglutininas (hemácias do paciente)	...	...	...	1/7
Crioaglutininas (hemácias "O") .	...	...	...	— (2)

Obs.: (1) Negativo na diluição mínima pesquisada de 1/2.

(2) Negativo na diluição mínima pesquisada de 1/7.

(3) Negativo na diluição mínima pesquisada de 1/8.

(4) Negativo na diluição mínima pesquisada de 1/16.

A reação de Frei foi negativa em ambos os casos.

Exames subsidiários — Hemograma (15-4-1953): Eritrócitos — 3.900.000 por mm³. Leucócitos — 10.200 por mm³. Hemoglobina — 11,6 g por 100 ml (72%). V.G. — 0,9%. Neutrófilos: promielócitos — 1%; metamielócitos — 2%; bastonetes — 7%; segmentados — 65%. Eosinófilos — 4%. Basófilos — 0%. Linfócitos: típicos — 12%; leucocitóides — 2%; atípicos — 0%. Monócitos — 7%. Plasmócitos — 0%.

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no escarro: negativa (11 e 12-4-1953).

Estudo radiológico — À admissão foi tirada radiografia do tórax (fig. 3).

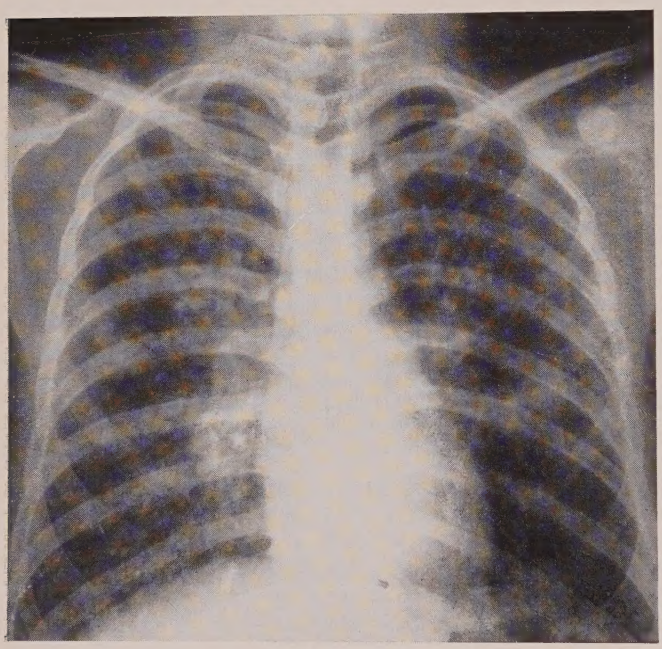


Fig. 3 — Caso S. J. S. — Radiografia de 10-4-53 — Velamento difuso dos campos pulmonares. Traves e estrias formando rêde de malhas apertadas irradiando-se dos hilos até a periferia e reforçada por nódulos pequenos, distribuídos bilateralmente, os quais confluem formando mancha no têrço médio do campo pulmonar esquerdo. O aspecto radiológico é o dos processos intersticiais pulmonares, em que o velamento e o desenho reticulado correspondem ao espessamento inflamatório do tecido intersticial dos pulmões e os nódulos à exsudação que atingiu grupos de alvéolos em vários pontos do parênquima pulmonar.

Posteriormente, no 20º e 28º dias de doença foram feitas novas radiografias que demonstraram involução gradativa e total do processo.

Estudo etiológico — Neste caso, o estudo etiológico foi feito numa única amostra de sangue colhido na convalescença. As provas efetuadas, com o propósito de obter informações sôbre a etiologia do processo, foram as mesmas referidas para o caso anterior, sendo que neste foi incluída na reação de inibição de hemaglutinação para influenza também outra amostra isolada em São Paulo, a A1São Paulo/2/1953 [6]. A verificação da presença de crioaglutininas, neste caso, foi feita com hemácias do grupo "O" e do próprio paciente.

Os resultados obtidos encontram-se no quadro I.

COMENTÁRIO E DISCUSSÃO

Nossos casos enquadram-se, perfeitamente, em seus aspectos clínico e radiológico, na síndrome das pneumonias atípicas ou intersticiais, da qual é sabido serem vírus do grupo da psitacose um dos agentes etiológicos.

O diagnóstico de infecção pulmonar por vírus do grupo da psitacose no primeiro, pôde ser estabelecido pela nítida e evidente ascensão do título de anticorpos fixadores do complemento frente ao antígeno de linfogranuloma venéreo, o qual, sabidamente, fixa o complemento na presença de sôro de paciente de psitacose, dada a existência de componente antigênico comum. Neste caso, a primeira amostra de sôro (6.º dia de doença) reagiu negativamente ao título de 1:8 e a última (65.º dia após o início da doença) reagiu positivamente ao título de 1:512.

A nítida ascensão do título de anticorpos que houve, entre a fase aguda e a convalescença, denotando infecção atual, e o quadro clínico-radiológico de pneumonia atípica autorizam o diagnóstico de infecção pulmonar por vírus do grupo da psitacose. Não se fêz tentativa de isolamento do agente etio-

lógico a partir do escarro, ou de outro material do paciente, porque, quando a sorologia revelou indícios de infecção por vírus do grupo da psitacose, era por demais tarde para qualquer medida neste sentido. Após o paciente referir ter estado, por diversas vêzes, nas proximidades de aviário, foi êste por nós inspecionado. As aves, no momento, estavam aparentemente sadias, referindo contudo, o encarregado que, na época em que o paciente delas se aproximara, uma apresentava-se doente, morrendo em seguida.

Cinco aves (duas juritis, dois periquitos e uma pomba de coleira) foram por nós examinadas sorològicamente (reação de fixação do complemento). Sòmente o sôro de uma delas (juriti) foi positivo a 1:16, o que indica infecção, atual ou anterior, por vírus do grupo da psitacose.

Tentativas de isolamento de vírus de algumas dessas aves, feitas por GIOVANONI (comunicação pessoal, 1956), do Instituto Biológico, resultaram negativas.

No primeiro caso podemos dizer que, sem dúvida, o processo pneumônico foi de infecção por vírus do grupo da psitacose. A provável fonte de infecção, aves com as quais o paciente teve contato ocasional, foi investigada. Os resultados encontrados não permitem conclusão indiscutível de que tenham sido elas a fonte primária de infecção.

No segundo caso o quadro clínico-radiológico foi o de processo de pneumonia intersticial grave, o qual, em suas manifestações clínicas, regrediu ràpidamente após a administração da clortetraciclina. O exame sorológico feito numa única amostra de sôro, obtida na convalescença, mostrou os resultados constantes no Quadro I. A conclusão a ser tirada dêsses resultados não é tão segura quanto a do primeiro caso, por não ter sido examinada amostra referente à fase aguda. Encontramos resultado positivo ao título de 1:256, na fixação do complemento feita com antígeno preparado a partir do vírus do linfogranuloma venéreo, o que nos levou a julgar que se trate, muito provàvelmente, de caso de infecção pulmonar por vírus do grupo da psitacose. O dado sorológico, mostrando um título elevado de anticorpos fixadores do complemento contra antígeno do grupo linfogranuloma venéreo-psitacose, correlacionado ao quadro clínico-radiológico apresentado pelo paciente, considerando-se também o fato de que o mesmo apresentou contato íntimo com psitacídeo doente, é altamente sugestivo de infecção pulmonar, por vírus do grupo da psitacose.

Em ambos, a clínica e a reação de Frei negativa indicam-nos que a positividade da fixação do complemento não é devida a infecção atual ou pregressa pelo vírus do linfogranuloma venéreo.

O encontro de título de 1:16 na reação de fixação do complemento para febre Q sugere infecção pregressa pela *Coxiella burneti* e a positividade de 1:16 da reação de inibição da hemaglutinação com o vírus da influenza A (PR/8), título êste habitualmente encontrado entre nós, deve ser interpretada do mesmo modo.

SUMMARY

Investigations of infections caused by a group psittacosis virus in São Paulo: clinical, radiological and laboratorial study of two cases of interstitial pneumonia.

A clinical, radiological and etiological study of two cases of atypical pneumonia is presented.

The etiology of the first case should be definitely established. In fact a negative complement fixation test for the psittacosis group of viruses in a first sample of serum collected on the 6th day became positive at a dilution of 1:512 in another sample taken 59 days later.

Complement fixation test for Q fever, hemagglutination inhibition tests for A, A1 and B influenza viruses were negative. Cold hemagglutinins could not be demonstrated in samples of serum taken on the 6th and on the 19th day of illness.

The intradermal test for lymphogranuloma venereum was negative.

Birds held in captivity were the probable primary source of infection. However, the investigations made were inconclusive in respect to this.

On the second case a complement fixation test for the psittacosis group of virus was positive at a dilution of 1:256 in a sample of serum taken on the 40th day of illness.

The hemagglutination inhibition tests for influenza A, A1 and B viruses, the complement fixation test for Q fever were either negative or positive in low titer, probably as a result of previous infections.

Cold agglutinins were positive at a titer of 1:7 and the intradermal test for lymphogranuloma venereum was negative.

The clinical, radiological and epidemiological data, in addition to the results of serological tests, highly suggest a virus of the psittacosis group as the probable agent of this infection.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Dr. João Valente Barbas Filho pelo relatório das radiografias referentes ao caso 2; à E. R. Squibb & Sons do Brasil pelo fornecimento do antígeno de linfogranuloma venéreo (Lygranum C.F.) e à Cyanamid Química do Brasil, Laboratórios Lederle, pelo antígeno de febre Q.

REFERÊNCIAS

1. MARIANTE, T. — Estudos de patologia clínica. Pôrto Alegre, Globo, 1936. p. 105-118.

2. SCHMIDTKE, L. — Psittakose: Entwicklung der epidemiologischen Lage ab 1931. Zentralbl. Bakt., I. Abt., Referate **165**:1-64, 1957-1958.

3. SOUZA, C. de — Um caso de psitacose. Gaz. clín. São Paulo **2**:285-290, 1904.

4. VALLE, L. A. R. do — Infecções do grupo da psitacose em psitacídeos e colombideos brasileiros. Congr. internac. Microbiol., V, Rio de Janeiro, 1950. Resumos dos trabalhos, p. 104.

5. VALLE, L. A. R. do; ARANTES, J. A.; COELHO, A. & BARRETO *neto*, L. P. — Um caso de psitacose comprovado pelo isolamento do vírus e reações sorológicas positivas. Trabalho apresentado à Secção de Medicina da Associação Paulista de Medicina em 20-8-1947.

6. VALLE, L. A. R. do; RODRIGUES, P. M. & MOURA, R. de A. — Estudos sôbre a epidemia de influenza ocorrida em São Paulo em 1953. I. Isolamento e identificação do vírus. Rev. paulista Med. **45**:415-416, 1954.

Recebido para publicação em 3 agôsto 1960.